

**GRAZYELLE SEBRENSKI DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO  
EM *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) COLETADOS NA USINA  
HIDRELÉTRICA DE SAMUEL- RONDÔNIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação e, Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos

**CURITIBA  
2007**

**GRAZYELLE SEBRENSKI DA SILVA**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA EXPOSIÇÃO CRÔNICA AO MERCÚRIO  
EM *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) COLETADOS NA USINA  
HIDRELÉTRICA DE SAMUEL- RONDÔNIA**

Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Biologia Celular e Molecular, Curso de Pós-Graduação e, Biologia Celular e Molecular, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro

Co-orientador: Prof. Dr. Wanderley Rodrigues Bastos

**CURITIBA  
2007**



“Uma bolsa de sabedoria vale mais do que uma de pérolas. O topázio de Cus não pode ser comparado a ela; ela não pode ser paga nem mesmo com o ouro na sua pureza”.  
(Jó 28:18,19)

## AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, professor **Dr. Ciro Alberto de Oliveira Ribeiro**, agradeço a confiança, tempo, dedicação, amizade e paciência, paciência, paciência...

Ao meu co-orientador, professor **Dr. Wanderley Rodrigues Bastos** por todo apoio, amizade, e pelo empurrão inicial nessa minha jornada científica;

À Professora **Dra. Helena Cristina da Silva de Assis**, do Departamento de Farmacologia – UFPR agradeço a disponibilidade;

A toda a equipe do Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná: **Prof. Marco Ferreira Randi, Fabíola Xochilt Valdez Domingos, Inês Rabitto, Daniel Bussolaro, Anna Lúcia Miranda, Patrícia França, Jocieli Maschio, Maria Luiza Araújo, Maritana Mela.**

Ao **Francisco Filipak Neto** por todo apoio, amizade...

A toda a equipe do Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de Rondônia: **Ronaldo, Ronaldinho, Beta, Jane** pela amizade e apoio com as coletas;

A Usina Hidrelétrica de Samuel (UHE), ELETRONORTE-RO;

Ao **Centro de Microscopia Eletrônica** de Universidade Federal do Paraná;

A todos os **Professores** do Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular que contribuíram com minha formação;

A todos os amigos...

Aos meus pais **Moacir Ribeiro da Silva** e **Arlete Aparecida Sebreński** da Silva, por toda a dedicação, amor e paciência;

Aos meus irmãos **Moacir Ribeiro da Silva Junior** e **Marcos Aurélio Sebreński da Silva**, sempre no meu coração;

Agradeço a **Jeová Deus** pela força espiritual e sabedoria concedida em todos os momentos na caminhada longa da vida.

## SUMÁRIO

RESUMO.....	I
ABSTRACT.....	II
1. INTRODUÇÃO .....	1
1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DO MERCÚRIO.....	2
1.2. O MERCÚRIO E O AMBIENTE .....	3
1.3. O MERCÚRIO E OS PEIXES .....	5
1.4. BREVE HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO E CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO.....	7
1.5. O MERCÚRIO E A AMAZÔNIA.....	8
1.6. O GARIMPO.....	11
1.7. RISCOS DE EXPOSIÇÃO HUMANA AO MERCÚRIO .....	13
1.8. A ESPÉCIE <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCH, 1794).....	15
1.9. BIOMARCADORES.....	16
1.9.1. Peroxidação lipídica .....	17
1.9.2. Catalase .....	18
1.9.3. GST (Glutathione-S-transferase) .....	19
1.9.4. Acetilcolinesterase .....	19
1.10. BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE.....	20
2. OBJETIVOS.....	23
2.1 OBJETIVO GERAL.....	23
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
3. ÁREA DE ESTUDO .....	24
3.1 BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO JAMARÍ .....	24
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	26
4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS .....	26
4.2. ANÁLISE DE Hg TOTAL.....	28
4.3. MICROSCOPIA DE LUZ (ML) .....	28
4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET) .....	28
4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV).....	29
4.6. CONTAGEM DOS CENTROS DE MELANO-MACRÓFAGOS .....	29
4.7. ATIVIDADE COLINESTERÁSICA .....	29
4.8. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	30
4.8.1. Análise da catalase .....	30
4.8.2. Análise da Glutathione -S-Transferase (GST).....	30
4.8.4 Quantificação protéica .....	31
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	31
5. RESULTADOS.....	33
5.1. ANÁLISE QUÍMICA DE MERCÚRIO .....	34
5.2. ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS .....	35
5.3. ATIVIDADE DA COLINESTERASE .....	37
5.4. BIOMARCADORES DE GENOTOXICIDADE.....	38
5.5. CONTAGEM DOS CENTROS DE MELANO-MACRÓFAGOS .....	40
5.6. ALTERAÇÕES TECIDUAIS E ULTRAESTRUTURAIS DE BRÂNQUIAS E FÍGADO DE <i>H. malabaricus</i> .....	40
6. DISCUSSÃO .....	57
7. CONCLUSÕES .....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS .....	83

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1. Exemplar de traíra – <i>Hoplias malabaricus</i> (BLOCK, 1794). -----	16
FIGURA 2. Usina Hidrelétrica de Samuel (RO). -----	24
FIGURA 3. Mapa da região de alagamento da Usina Hidrelétrica de Samuel -----	25
FIGURA 4. Concentração de mercúrio total em músculo axial de <i>H. malabaricus</i> -----	34
FIGURA 5. Concentração de mercúrio total no fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	34
FIGURA 6. Atividade das GSTs em fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	35
FIGURA 7. Atividade da Catalase em fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	36
FIGURA 8. Peroxidação lipídica em fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	36
FIGURA 9. Atividade da colinesterase (ChE) em músculo axial de <i>H. malabaricus</i> -----	37
FIGURA 10. Comparação entre a presença de anomalias nucleares em eritrócito de <i>Hoplias malabaricus</i> coletados no Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO). -----	38
FIGURA 11. Anomalias nucleares observadas nos esfregaços sanguíneos de <i>H. malabaricus</i> -----	39
FIGURA 12. Contagem dos centros de melano-macrófagos (CMM) e melano-macrófagos (MM) livres presentes no fígado de <i>Hoplias malabaricus</i> -----	40
FIGURA 13. Organização estrutural (ML) das brânquias de <i>H. malabaricus</i> -----	45
FIGURA 14. Organização das brânquias (MEV) de <i>H. malabaricus</i> -----	46
FIGURA 15. Organização das brânquias (MEV) de <i>H. malabaricus</i> -----	47
FIGURA 16. Organização ultraestrutural (MET) das lamelas secundárias de <i>H. malabaricus</i> -----	48
FIGURA 17. Organização ultraestrutural (MET) das lamelas secundárias de <i>H. malabaricus</i> -----	49
FIGURA 18. Brânquias de <i>H. malabaricus</i> -----	50
FIGURA 19. Organização estrutural (ML) do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	51
FIGURA 20. Organização estrutural do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	52
FIGURA 21. Organização ultraestrutural (MET) do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	53
FIGURA 22. Organização ultraestrutural (MET) do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	54
FIGURA 23. Organização ultraestrutural (MET) do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	55
FIGURA 24. Organização ultraestrutural (MET) do fígado de <i>H. malabaricus</i> -----	56
TABELA 1. Dados de comprimento e massa dos espécimes de <i>H. malabaricus</i> coletados entre os meses de Agosto e Novembro de 2005. ....	33
TABELA 2. Avaliação histopatológica de fígado por ML em <i>H. malabaricus</i> . ....	41
TABELA 3. Avaliação histopatológica de brânquias por ML. em <i>H. malabaricus</i> . ....	42

## RESUMO

O mercúrio (Hg) tem como características a capacidade de se bioacumular e biomagnificar ao longo da cadeia alimentar. Devido às propriedades tóxicas desse metal e à intensa atividade garimpeira na região Amazônia, aumentou a preocupação com os possíveis danos que o mercúrio empregado nessa atividade pode trazer ao ambiente. Nesse estudo 27 espécimes de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), foram coletados na Usina Hidrelétrica de Samuel (RO), situada no Rio Jamarí, uma área que sofre influência do garimpo na região. Os peixes foram sacrificados, e amostras foram coletadas para a análise química de Hg (fígado e músculo), avaliações bioquímicas (Glutathione-S-transferase (GST), Catalase e Peroxidação Lipídica) e morfológicas em brânquia e fígado (Microscopia de Luz, Microscopia Eletrônica de Varredura e Transmissão). Dos valores médios de mercúrio encontrados no músculo dos peixes, 18,5% ultrapassaram a concentração máxima sugerida pela Organização Mundial de Saúde (WHO) que é de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg para o consumo humano. Não houve diferença estatística significativa entre a atividade das enzimas (GST e catalase) e os níveis de peroxidação lipídica usados como biomarcadores bioquímicos no fígado de *H. malabaricus* e as concentrações de mercúrio encontradas neste tecido. Nas análises histopatológicas em fígado foram observadas alterações como: necroses, infiltração leucocitária, grande número de melanomacrófagos e desorganização tecidual. Nas brânquias houve a presença de regiões com intensa proliferação celular, fusão lamelar, presença de aneurismas e parasitas. O estudo com os biomarcadores na Usina Hidrelétrica de Samuel no Rio Jamarí foi pioneiro nessa localidade. Através desse trabalho foi possível avaliar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos em laboratório para o estudo dos efeitos do mercúrio em regiões impactadas pelo garimpo, demonstrando que os biomarcadores morfológicos refletem melhor os danos agudos e cumulativos em detrimento dos danos bioquímicos que podem ser modulados pelas condições ambientais variáveis.

## ABSTRACT

Mercury is able to bioaccumulate in live of aquatic organisms and biomagnify along the feed chain. Due to the toxic properties of this metal and its intensive and constant use in goldmining in the Amazon region, more studies have been evidencing the potential damages to nature ecosystem and to the environment. In the present study 27 specimens of the *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794), were collect in Samuel Hidreletrical Usine (SHU) (RO), situated in Jamarí River, an impacted region by goldmining activities. The individuals were sacrificed and samples of liver and muscle were collect for chemical (total mercury), biochemical (GST, catalase and lipidic peroxidation) and morphological analysis (light microscopy, scanning and transmission electron microscopy). The medium values of mercury found in fishes muscle, 18.5%, passed the maximal concentration established by World Healthy Organization (WHO) ( $0.5 \mu\text{g g}^{-1}$  of Hg) for human consume. There was no significant statistical difference between the activity of the enzymes used as biochemical biomarchers (GSTs, Catalase) and for the levels of lipidic peroxidation in *Hoplias malabaricus* livers from SHU on Jamari River and the mercury concentration in the liver. This biochemical study was the first one using this species at Amazon region. Liver histopatological analysis showed damages as necrosis, inflammation, high incidence of melanomacrophages and tissue disorganization. In gills were also observed lesions as the presence cellular proliferation, lamellar junction, aneurisms and parasites occurrence. The present study showed the applicability of methods developed in laboratory under controlled conditions in field studies where the impact of pollutants is evaluated. Also, according the present data was observed that the morphological findings were more efficient to show the chronic effects of mercury in *H. malabaricus* then the biochemical biomarkers, which tend to be modulated by the environmental conditions.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos *in vivo* que utilizam peixes como bioindicadores de qualidade aquática na avaliação da contaminação por mercúrio têm sido realizados para atender diferentes objetivos como o biomonitoramento de áreas impactadas como nos estudos de bioensaios.

Mela (2004), através da espécie *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) (Traíra) utilizada como modelo biológico na exposição trófica e subcrônica ao metilmercúrio, demonstrou que este contaminante é tóxico na dose e tempo de exposição testada, causando uma variedade de lesões nos tecidos e órgãos dos indivíduos expostos. A contaminação trófica e subcrônica foi realizada através de exemplares vivos de lambaris (*Astyanax* sp.), os quais receberam intraperitonemente um volume de solução aquosa de MeHg correspondendo a uma dose de 0,075 µg/g de traíra.

Tendo em vista que na região Amazônica a atividade garimpeira, principalmente na Bacia do Rio Madeira tem sido muito intensa nos últimos anos, faz-se necessário o estudo dessas áreas utilizando algumas espécies de peixes para o monitoramento da qualidade destes ecossistemas. Partindo de estudos *in vivo* que comprovaram a ação tóxica do metilmercúrio em laboratório após exposição trófica e subcrônica, simulando a condição natural, foi possível através deste trabalho demonstrar a aplicabilidade dos métodos desenvolvidos para o estudo de regiões impactadas pelo garimpo como a Amazônia.

O Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná-UFPR, juntamente com o Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de Rondônia - UNIR tem desenvolvido técnicas diferenciadas de monitoramento da contaminação por mercúrio em ambientes naturais. O desenvolvimento deste projeto possibilitou a validação das metodologias já desenvolvidas numa interpretação conjunta tanto dos fatores relacionados com a bioacumulação do metal como com os efeitos decorrentes da presença deste nos tecidos.

O mercúrio (Hg) é considerado um importante poluente ambiental que pode ser encontrado nos ecossistemas aquáticos e terrestres e que tem sido alvo de diversos estudos em escala mundial.

### 1.1. CARACTERÍSTICAS FÍSICO QUÍMICAS DO MERCÚRIO

Devido às propriedades do mercúrio este pode apresentar diferentes formas químicas no ambiente natural. A conversão entre essas diferentes formas proporciona a base para o complexo padrão de distribuição do Hg em seu ciclo local e global (LINDQVIST et al., 1984).

O mercúrio e outros metais estão classificados como metais pesados, numa lista que inclui cerca de 40 elementos com densidade superior a cinco (SILVA, 1988), e é encontrado entre os elementos de transição da Tabela Periódica, no grupo IIB juntamente com o zinco e o cádmio. A forma elementar ( $\text{Hg}^0$ ) pode se combinar com os metais nobres (Au, Ag, Pt, Pd) formando amálgamas e é o único metal líquido nas condições normais de pressão e temperatura. Outra característica físico-química importante inclui: alta tensão superficial; alta gravidade específica (13.55 a 20°C); baixa resistência elétrica. (SCHOROEDER E MUNTHER, 1998).

As quatro formas químicas mais importantes do Hg que ocorrem no ambiente são: mercúrio elementar ( $\text{Hg}^0$ ) com alta pressão de vapor e baixa solubilidade na água; o mercúrio inorgânico divalente ( $\text{Hg}^{+2}$ ) que tem uma alta afinidade por muitos ligantes orgânicos e inorgânicos, especialmente aqueles contendo enxofre; a forma monovalente ( $\text{Hg}^+$ ) altamente instável e o metilmercúrio ( $\text{CH}_3\text{Hg}^+$ ) resistente a degradação ambiental, é capaz de atravessar as barreiras biológicas e portanto ser rapidamente incorporado pela biota, mas é lentamente destruído pelos organismos vivos (LINDQVIST et al., 1982).

Existem sete isótopos estáveis de Hg onde quatro não são estáveis e dois desses apresentam uma meia vida curta (isótopos com meia vida curta:  $\text{Hg}^{197}$  com uma meia-vida de 64.1h e  $\text{Hg}^{203}$  com uma meia vida de 46.6 dias) (SCHOROEDER E MUNTHER, 1998).



## 1.2. O MERCÚRIO E O AMBIENTE

O conhecimento do comportamento do Hg é muito importante, a fim de estabelecer a sua interação com o ambiente ou, em outras palavras, seus processos bióticos e abióticos de mobilização e modelo de transporte através de sistemas aéreos, terrestres e aquáticos (SILVA, 1988).

O Mercúrio pode ser considerado um dos metais pesados mais tóxicos, tendo diferentes níveis de toxicidade e apresentando diferentes formas químicas no ambiente (MALM et al., 1995).

Quando estudamos a contaminação por mercúrio e suas conseqüências toxicológicas temos que ter em mente a forma química que ele é liberado, e a que extensão ele pode ser transportado assumindo sua alta volatilidade, bem como o tipo de transformação química que ele pode sofrer, sofrendo ação biológica ou não, e se o metilmercúrio será formado. Essas são questões essenciais para se entender o destino e o caminho do Hg no ambiente (MALM et al., 1995).

O mercúrio não tem a mesma distribuição na atmosfera e pode ser largamente distribuído pela circulação regional e global. Além disso, esse metal existe em formas variadas ou como vapor livre, junto com partículas ou absorvido como cloreto de mercúrio ou como monometil e dimetilmercúrio (SILVA, 1988).

O Ciclo global do Hg envolve sua volatilização, transporte, deposição, acumulação e migração; é o resultado de processos físicos, químicos e bioquímicos extremamente complexos, muitos dos quais ainda não foram bem definidos. A disponibilização do Hg na crosta terrestre ocorre pela evaporação tanto dos corpos hídricos naturais quanto dos solos e das emissões vulcânicas que contém mercúrio em sua constituição. A deposição do mercúrio autóctone em solos ocorre com o processo intempérico, já o alóctone é depositado via transporte aéreo (volatilização) e pelas águas (rios, mares, lagoas, oceanos). O processo deposicional ocorre concomitantemente ao transporte. O processo de acumulação, o tempo de residência do Hg em ambientes aquáticos e sua distribuição corporal nas espécies de peixes precisam ser definidos, em paralelo a estudos dos processos comportamentais destas espécies; os condicionantes físico-químicos desta etapa não estão bem compreendidos (BASTOS, 2004).

O Ciclo atmosférico do Hg é determinado por fatores naturais e antropogênicos, a complexa química atmosférica e os processos de deposição seca e úmida. A química atmosférica e especialmente a deposição do Hg estão fortemente ligados, especialmente a especiação que o mercúrio proveniente de diferentes fontes sofre na atmosfera (EBINGHAUS et al., 1998).

A descarga de mercúrio na atmosfera pode ocorrer por fontes naturais, como as minas de mercúrio (cinábrio HgS), gases vulcânicos, áreas geotérmicas, desgaseificação da crosta terrestre, e por fontes antropogênicas (causadas pelo homem) (SILVA, 1988).

As emissões de Hg proveniente de fontes antropogênicas são lançadas no ar, como resultado da combustão descontrolada de carvão e óleo combustível, ambos contendo quantidades traço do elemento (que atingem várias centenas de ppm em alguns carvões), e da incineração de lixo municipal, que contém mercúrio em alguns produtos, como as baterias. De fato, as indústrias de energia que utilizam carvão como combustível e as incineradoras de lixo são, provavelmente, as maiores fontes atuais de emissões de Hg para a atmosfera. Essas fontes de Hg aumentaram substancialmente no século XX e, atualmente, concorrem com os vulcões, inicialmente a fonte predominante de Hg transportado por via aérea. Estima-se que a emissão anual de Hg ao ambiente, procedente de todas as fontes, exceda 10.000 toneladas (BAIRD, 2004).

As indústrias de cloro-álcali que produzem hidróxido de sódio eletroquimicamente onde o cloro e o hidrogênio são os produtos também é uma das fontes de lançamento de Hg no ambiente. O procedimento industrial de processamento do cloreto de sódio envolve: primeiramente a acidificação do cloreto de sódio em células eletroquímicas onde o mercúrio é usado com catodo e o titânio o anodo, um amálgama metálico de sódio e mercúrio é produzido bem como o cloro; num segundo procedimento grafite pulverizado e amálgama Na-Hg são o catodo e o anodo respectivamente, hidróxido de sódio e hidrogênio são produzidos. Cerca de 30m<sup>3</sup>/h e salmoura é processada. O empobrecimento da solução NaCl no final do processo industrial é feito através da troca catiônica com uma resina contendo grupos (-SH) onde parte o Hg é removido e reinjetado nas fontes de

rochas de sal. A água utilizada para lavar a célula e processar a resina, rica em mercúrio é descartada (SCERBO et al., 2005).

### 1.3. O MERCÚRIO E OS PEIXES

Os peixes constituem um importante recurso alimentar, seja pelo seu potencial comercial já que em vários países são a principal fonte de proteína da população, seja pelo aspecto ecológico, não menos importante para os ecossistemas aquáticos. Vários trabalhos utilizam estes vertebrados para avaliar efeitos tóxicos de diversos contaminantes dentre eles os organofosforados, carbamatos e outros metais pesados (SILVA FILHO et al., 2000).

A contaminação de organismos aquáticos, particularmente dos peixes, pelo mercúrio lançado no ambiente pela atividade de garimpo de ouro tem sido encontrada em vários rios da Amazônia e tem recebido mais atenção dos pesquisadores do que qualquer outro aspecto da contaminação por mercúrio nessa região (LACERDA E SALOMONS, 1992).

A poluição da água induz mudanças patológicas nos peixes (distúrbios circulatórios nas brânquias, hipertrofia, hiperplasia tecidual, infiltração leucocitária, tumor etc.), principalmente quando eles estão expostos a altas concentrações de contaminantes, especialmente em áreas onde a taxa de diluição destes é baixa. Um indicador histopatológico de exposição a um contaminante é uma ferramenta que permite ter acesso ao grau de poluição e seus efeitos, particularmente quando os contaminantes são: (1) fracamente decompostos; (2) alta eficácia biológica; (3) possui alto potencial de acumulação e (4) influenciam um ao outro no caso de múltiplos contaminantes. Nos peixes a poluição da água pode levar as diferentes mudanças e alterações bioquímicas em uma única célula ou em populações inteiras de células (BERNET, 1999).

A acumulação de mercúrio em peixes é fortemente influenciada pela dieta, por outro lado a dieta controla o crescimento, e este tem sido um importante fator estudado porque o crescimento do peixe pode influenciar as concentrações de mercúrio e seu potencial de biodiluição à medida que o

organismo tem aumento corpóreo resultado das diferenças dos processos bioenergéticos (SIMONEAU et al., 2004).

A exposição a altas concentrações de Hg dissolvido na água causa danos nas brânquias e interfere na troca de íons e osmoregulação dos peixes. Experimentos demonstraram que as trocas de íons pela enzima  $\text{Na}^+$  e  $\text{K}^+$  - ATPase são inibidas pelo mercúrio, as altas concentrações de Hg em laboratório produzem um efeito muito maior do que as encontradas normalmente no ambiente (JAGOE et al., 1996). Os compostos de mercúrio também têm uma alta afinidade por proteínas, e induzem danos nas membranas provavelmente devido a sua forte interação com lipídeos (GIREALT et al., 1996).

A bioacumulação resulta no transporte trófico de mercúrio ao longo da cadeia alimentar, e é definida com o aumento da acumulação de Hg no peixe. Na cadeia trófica, as espécies topo de cadeia (consumidores terciários) podem servir como biomarcadores da contaminação por Hg. Selecionar uma espécie de peixe sensível ao Hg é importante para o monitoramento da contaminação ambiental (DÓREA et al., 2004).

Os dados disponíveis sobre as concentrações de Hg na biota Amazônica são suficientes para confirmar uma contaminação generalizada dos ambientes fluviais amazônicos. Em vários locais as concentrações de Hg são quase 5 vezes superiores aos valores máximos permissíveis para o consumo humano. Outros organismos importantes para as cadeias alimentares amazônicas como os caracóis de água doce e as macrófitas aquáticas também apresentam altas concentrações de Hg, indicando uma contaminação generalizada na região. A natureza complexa das interações entre os componentes das cadeias alimentares da Amazônia tornam urgente a coleta de dados sobre concentrações de mercúrio em outros importantes (top) carnívoros da região amazônica, como os mamíferos aquáticos, os répteis e as aves, que tem uma estrutura mais complexa de transferência de mercúrio através da cadeia alimentar (LACERDA E SALOMONS, 1992).

#### 1.4. BREVE HISTÓRICO DA UTILIZAÇÃO E CONTAMINAÇÃO POR MERCÚRIO

O mercúrio (Hg) reunia a beleza da prata, sua liquidez única entre os metais em temperaturas ordinárias, e é conhecido pelo homem desde tempos pré-históricos principalmente pela facilidade em ser isolado em sua forma metálica. Foi considerado pelos sábios e durante muitos séculos como um estágio intermediário na formação de metais nobres e era considerado essencial na “conversão” de outros metais base em ouro, (MALM, 1991).

A primeira importante aplicação do mercúrio provavelmente foi em 1643, quando Torricelli encontrou o mercúrio fechado em um tubo que sempre mantinha um nível equivalente a 760 milímetros do nível do mar, essa observação mais tarde levou ao desenvolvimento do barômetro, e as observações sobre sua pequena variação de pressão ao monômetro. O termômetro de Hg foi desenvolvido por Fahrenheit na Holanda em 1714 e são usados até os nossos dias, mas podem constituir uma fonte potencial de exposição ao homem (EISENBUD, 1978).

O primeiro caso relatado de contaminação em massa por mercúrio ocorreu em 1950 quando habitantes de Minamata no Japão, foram envenenados ao consumir peixes e mariscos contaminados por metil-mercúrio (LINDQVIST et al., 1984).

A epidemia de Minamata foi a primeira a ser estudada. Até 1958 uma indústria na Baía de Minamata usava o mercúrio como um agente catalítico na fabricação de acetaldeído e cloreto de vinil. Traços de cloreto de mercúrio foram encontrados nos efluentes da baía, mas este composto é moderadamente tóxico não podendo ser o causador dos sintomas de contaminação observados. Depois de diversas investigações concluiu-se que o cloreto de mercúrio era depositado no sedimento, e convertido pela ação microbiológica a metilmercúrio, um composto orgânico altamente tóxico (EISENBUD, 1978).

Altos níveis de exposição ao Hg em Minamata produziram sérias doenças neurológicas nos adultos, mas a maior manifestação foi à doença de Minamata congênita de crianças que nasceram de mães contaminadas com altos níveis de Hg. Esses bebês nasceram com severos danos cerebrais e retardo mental. Muitas dessas vítimas sobreviveram até os 20 anos, e muitos sobrevivem até os nossos

dias. Autópsias realizadas nas vítimas revelaram lesões destrutivas do cerebelo e em várias partes do córtex (GOCHFELD, 2003).

Ao mesmo tempo em que casos de contaminação por mercúrio eram encontrados no Japão, foi descoberto no Iraque na década de 70 também casos de intoxicação pelo Hg, quando centenas de famílias fazendeiras consumiram sementes tratadas com fungicida contendo mercúrio orgânico que eram para serem usadas no plantio. Similarmente acidentes como estes foram relatados também no Paquistão, Guatemala e Novo México (EINSENBUD, 1978).

Em agosto 1996 a Professora de química do Dartmouth College (USA) usou dimetilmercúrio para calibrar um equipamento. Em janeiro de 1997 ela começou a ter dificuldades para falar e andar de modo desajeitado. Dentro de três semanas ela entrou em coma. No diagnóstico verificaram-se altas concentrações de Hg no sangue. No tempo em que ela esteve lúcida ela revelou ter derramado algumas gotas de dimetilmercúrio em suas luvas, este penetrou e foi absorvido pela pele (NIERENBERG et al., 1998).

Em junho de 2000 um caminhão carregando frascos contendo mercúrio elementar para uma mina de ouro nas montanhas do Peru derrubou Hg ao longo da estrada contaminando várias vilas no caminho. Vários moradores das vilas coletaram frascos contendo Hg e usaram em suas práticas culturais. As concentrações de Hg nas residências ultrapassaram 1ppm de Hg (GOCHFELD, 2003).

## 1.5. O MERCÚRIO E A AMAZÔNIA

A corrida do ouro na América do Sul foi uma conseqüência do aumento do preço do ouro durante 1970, e também a forte associação com as dificuldades econômicas e sociais incluindo a falta de emprego, pobreza etc. (PFEIFFER E LACERDA, 1988).

Na década dos anos oitenta ocorreu na região amazônica uma incrível visibilidade da atividade garimpeira, conseqüência do segundo ciclo minerário da economia nacional e de uma política de ocupação de fronteiras. O impacto inicial gerado pela descoberta de grandes jazidas minerais deu lugar rapidamente a

questões econômicas de seu melhor aproveitamento e da degradação ambiental, fruto do assoreamento dos rios, da contaminação por mercúrio e da descaracterização da paisagem. A riqueza do ouro como valor positivo ficou atrelado à importância simbólica atribuída à preservação das sociedades indígenas, ao santuário ecológico (Amazônia), as condições de trabalho concretas a que estão submetidos os garimpeiros (BARBOSA E LOBATO, 1990).

Desde 1980, o Brasil é o primeiro país da América do Sul com produção de ouro anual entre 200 e 300 toneladas por ano nos últimos 20 anos desde a década de 70 (90% proveniente da mineração informal, garimpo), seguido da Colômbia, Venezuela, Peru e Bolívia. Essa produção de ouro corresponde a aproximadamente 2000 a 3000 toneladas de mercúrio sendo lançados no ambiente da Amazônia durante a corrida do ouro. O total de Hg que foi lançado no ambiente no período colonial foi de aproximadamente 600 toneladas. A mineração de ouro e prata durante o período colonial utilizou principalmente o minério primário, mas a corrida de ouro na Amazônia afetou principalmente os depósitos de ouro secundários (reservas de ouro coluvial ou aluvial) nos solos e sedimentos dos rios, onde o mercúrio é lançado diretamente durante o processo de mineração nos corpos de água (MALM, 1998).

Durante o pico da corrida de ouro estimou-se que o número de garimpeiros somente no Brasil era de 1.600.000 (PFEIFFER E LACERDA, 1998).

Os estudos do transporte do Hg nos corpos de água, e sua transformação em Metilmercúrio e contaminação da cadeia alimentar, incluindo a contaminação humana, são recentes nos países da América do Sul. Na metade de 1980 as pesquisas ambientais tiveram início na Bacia do Rio Amazonas (MALM, 1998).

As Bacias dos Rios Tapajós e Madeira foram as mais atingidas no que se chamou “Corrida do Ouro” no século XX, causada pela mineração informal que utiliza o mercúrio como agente amalgamador no processo de retenção do ouro. Nos dias atuais, o garimpo ocorre numa escala expressivamente inferior, porém a região vem sofrendo carga dos países de fronteira, onde a mineração está em plena ascensão, podendo ser um estoque residual de Hg (BASTOS, 2004).

A preocupação das autoridades ambientais no que diz respeito ao garimpo, não se deve apenas as grandes quantidades de mercúrio envolvidas, mas também



ao fato de que a complexidade e a importância ecológica da maioria dos ecossistemas amazônicos podem resultar em impactos totalmente imprevisíveis sobre o ambiente e sobre a saúde da população da região. Todavia, a interpretação exata do perigo potencial dessa atividade é prejudicada pelo pouco que se conhece sobre o comportamento do Hg nesses ecossistemas, inclusive sua biogeoquímica local, em particular a capacidade de metilação do mercúrio nos ecossistemas amazônicos, sua interação com os processos dos ecossistemas e dos caminhos naturais para este chegar à população humana local (LACERDA E SALOMONS, 1992).

Entende-se que há necessidade de mais estudos enfocando o sistema aquático e as populações ribeirinhas da Bacia do Rio Madeira, pois se tem encontrado concentrações elevadas de Hg em algumas espécies de pescado, o que justifica a continuidade de avaliações periódicas, guiando-se pela sazonalidade no consumo de pescado (BASTOS, 2004).

Em um estudo comparativo realizado recentemente entre os anos de 2001 e 2003, nos diferentes compartimentos do ambiente (solo, sedimento de fundo e particulado em suspensão) e com amostras de cabelo humano, no Baixo Madeira as maiores concentrações de Hg foram encontradas nos peixes carnívoros, e as populações ribeirinhas apresentaram concentrações de Hg acima dos valores sugeridos pela Organização Mundial de Saúde (WHO). Os valores de Hg encontrados no solo, sedimento de fundo e particulado em suspensão apresentaram valores menores quando comparados aos estudos realizados em 1990 (BASTOS et al., 2006).

Apesar da redução das emissões de Hg para a Bacia do Rio Madeira proveniente das atividades garimpeiras, grandes quantidades de Hg ainda se fazem presentes e são mobilizadas na região. A redução das concentrações de Hg parece estar restrita às regiões mais próximas às áreas antigas de garimpo. Desde a queda rápida da mineração no Brasil em 1990, ocorreu um aumento dessa atividade na Bolívia e Peru incluindo tributários do Rio Madeira. Finalmente os processos biogeoquímicos típicos dos rios Amazônicos e os lagos marginais estão prontos para remobilizar o Hg com eficiente metilação, eventuais processos de bioacumulação e biomagnificação (BASTOS et al., 2006).



## 1.6. O GARIMPO

Desde os tempos pré-industriais a quantidade de Hg emitido para a atmosfera tem no mínimo dobrado. Globalmente, aproximadamente 1 milhão de toneladas de Hg foi extraído das minas de cinábrio durante os últimos 500 anos. Essa produção de Hg tem sido utilizada na mineração, mas ultimamente o Hg tem sido empregado na indústria (LARS et al., 2003).

A produção de Hg primário tem mudado dramaticamente durante os últimos tempos, a produção de Hg que sempre dominou nos cinturões de mercúrio entre o oeste do Mediterrâneo e a Ásia Central, tem também aparecido na Europa onde só as minas da Espanha têm contribuído com um terço da produção mundial de Hg. Atualmente as minas que mais produzem no mundo estão localizadas em Almadén na Espanha (236 t de Hg foram produzidas em 2000), Khaydarken no Kazaquistão (550 t), Argéria (240 t), China (200 t). O Hg empregado na extração de outros metais (ouro, cobre, zinco), em 2000 incluí 48 t no Peru, 45 t na Finlândia e 15 t nos Estados Unidos (LARS et al., 2003).

A atividade garimpeira é bastante comum na região Amazônica e a potencial contaminação pelo mercúrio usado para coletar o ouro aluvial tem sido uma questão muito comum (AKAGI et al., 1995).

Grupos de pesquisa do Brasil têm estimado que o mercúrio total perdido durante o processo de extração do ouro na Bacia do rio Amazonas estão na ordem de 100 toneladas por ano, onde 45% do Hg é lançado nos rios e 55% para a atmosfera (PFEIFFER E LACERDA, 1988).

A contaminação ambiental pelo mercúrio na Amazônia originalmente ocasionada pelo mercúrio metálico é diferente da que ocorreu no Japão e Iraque, originada pelo metilmercúrio. Nas áreas de mineração o envenenamento por mercúrio inorgânico pode ocorrer de maneira ocupacional, ou as pessoas que moram nas proximidades das áreas de garimpo estão mais susceptíveis a exposição pelo mercúrio inorgânico e metilmercúrio (AKAGI, 1995).

O mercúrio é usado para a separação das partículas finas de ouro através de amalgamação, após uma etapa de pré-concentração gravítica da fração pesada dos sedimentos do rio, solos ou minério moído, dependendo do local do garimpo.

Depois da etapa de amalgamação, a mistura de Au-Hg em geral é queimada em retortas ao ar livre, portanto emite vapor de mercúrio a atmosfera. Durante o processo de amalgamação, uma quantidade variável de mercúrio metálico também se perde nos rios e solos pelo manuseio em condições de campo precárias e devido à vaporização. Além disso, descartam-se rejeitos ricos em Hg na maioria das áreas de garimpo (LACERDA E SALOMONS, 1992).

A garimpagem depende do local onde é realizada, assume diversas formas e emprega diferentes metodologias. Basicamente, consiste de um processo de separação gravimétrico do ouro e recuperação deste com o auxílio do Hg. Em garimpos de aluvião, no leito de rios, são comuns a utilização de balsas (1) com mergulhadores operando com motores e tubos, que aspiram o cascalho do fundo dos rios ou das dragas (2), mais mecanizadas e sofisticadas, que conseguem escavar em profundidades bem maiores. Em antigos leitos, ou nas margens deles, quando nas épocas secas, ocorrem os garimpos chamados de baixão (3) ou de barranco (4), (MALM, 1991).

Em outro processo utilizado nos rios amazônicos, o ouro é extraído por dragagem dos sedimentos do fundo. O material aurífero passa por peneiras de ferro com malhas de tamanhos diferentes, para remover as pedras grandes. Moinhos são usados na operação. O material passa então por calhas acarpetadas que retêm as partículas mais pesadas. Essa operação dura de 20 a 30 horas quando então a draga pára e a fração pesada é coletada em barris de amalgamação, e pode ser feita manualmente ou usando-se agitadores mecânicos. Os rejeitos do processo são despejados nos rios. A vaporização de Hg e perdas devido ao manuseio mal feito também acontecem (LACERDA E SALOMONS, 1992).

Em Rondônia a corrida de garimpagem de ouro iniciou-se em 1978 crescendo até 1985 quando começou a se estabilizar (MALM, 1991).

Na Amazônia, resultados de pesquisas anteriormente realizadas indicaram a contaminação por Hg em rios, floresta e, mais recentemente, pontos no Rio Madeira com níveis 100 vezes superiores aos naturais. E no ar altas concentrações foram verificadas em situações de queima de Hg no campo e em lojas de requeima, nas cidades Amazônicas (PFEIFFER et al., 1992).

O ouro encontrado nos aluviões mineralizados do Rio Madeira é de granulometria bastante fina, peculiaridade que dificulta a separação manual desse minério das demais partículas extraídas; por falta de opção faz-se necessário o uso do Hg no processo de extração do ouro. Estudos de prospecção realizados pela Mineração Rio Novo Ltda., entre as Cidades de Guajará-Mirim e Abunã, revelaram mineralizações auríferas até a profundidade de 20m, em sedimentos (BASTOS, 1998).

### 1.7. RISCOS DE EXPOSIÇÃO HUMANA AO MERCÚRIO

Os peixes constituem a principal fonte de alimento proveniente do ecossistema aquático na Amazônia, e este hábito representa uma importante atividade cultural entre as populações indígenas. Sendo assim, a ingestão de Hg através do consumo de peixe tem sido a maior rota de exposição ao Hg para as populações ribeirinhas que residem nas margens do rio Madeira (BOISCHIO E HENSHEL, 2000).

A alimentação é a fonte principal de metilmercúrio absorvida pelo homem do ambiente, o que torna extremamente importante conhecer quais os níveis de mercúrio encontrados nos peixes utilizados como alimento. Concentrações de Hg encontradas na carne vermelha e cereais são de cem a mil vezes menores do que os valores encontrados nos peixes. Consequentemente uma pessoa que come regularmente peixe contendo altos níveis de Hg estará mais exposto ao metal (WHO, 1991).

O envenenamento por mercúrio pode afetar o sistema nervoso central, prejudicar a visão e a sensibilidade, bem como levar a perda da coordenação muscular por causar mudanças patológicas no cérebro. Além disso, o metilmercúrio é facilmente transferido para o feto atravessando facilmente a barreira placentária, podendo causar sérios danos ao cérebro que é muito sensível nos estágios iniciais de desenvolvimento (WHO, 1991).

Os efeitos tóxicos do mercúrio elementar são produzidos depois de sua oxidação no organismo, devido a sua grande afinidade pelos grupos sulfidrilas das proteínas. No entanto, o mercúrio também pode ser encontrado ligado a

grupos carboxílicos, amidas e aminas. Nas células o mercúrio é um potente desnaturador de proteínas e inibidor de aminoácidos, interferindo nas funções metabólicas celulares. Este metal também causa sérios danos à membrana celular ao interferir em suas funções e no transporte através da membrana, especialmente dos neurotransmissores cerebrais (CRUZ, 1995).

A principal questão do comportamento toxicológico são os complexos de Hg. O mercúrio é genotóxico e causa ilicitamente a formação de micronúcleos em células de mamíferos, inibe a polimerização dos microtubulos em concentrações de até 1 $\mu$ M e a inibição completa a uma concentração de 10 $\mu$ M. Altas concentrações de Hg causam a formação de agregados, de proteínas mais Hg (STOIBER et al., 2004).

Resultados de estudos entre humanos e animais indicam que 80% do mercúrio metálico inalado na forma de vapor é retido pelo corpo, sendo que o os rins são os principais órgãos alvos (WHO, 1991).

A exposição aguda ao vapor de Hg pode acarretar dores no peito, dispnéia, tosse, pneumonia e em alguns casos levar até mesmo a morte. A ingestão dos compostos de mercúrio, particularmente o cloreto de Hg, tem causado úlceras, gastroenterites, necrose nos túbulos renais causando também a morte (WHO, 1991).

A exposição crônica ao vapor de mercúrio leva a uma forma de toxicidade dominada por afeitos neurológicos. Os primeiros sinais não específicos de intoxicação, denominados síndrome astênica-vegetativa ou micromercurialismo, incluem sintomas como fraqueza, fadiga, anorexia, perda de peso. Com o aumento da exposição, o tremor característico aparece e vai aumentando de intensidade chegando aos violentos espasmos crônicos das extremidades. Concomitante ao desenvolvimento dos tremores, mudanças psicológicas e do comportamento também ocorrem, com sintomas como excitabilidade, perda de memória, insônia, depressão severa, irritabilidade, timidez excessiva e perturbação mental. Outros sintomas incluem ataxia, perturbação visual, gengivite, salivação excessiva, gosto metálico e perda dos dentes (CRUZ, 1995).

### 1.8. A ESPÉCIE *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794)

A traíra, *Hoplias malabaricus* (BLOCH, 1794), é uma espécie de ampla distribuição na América ocorrendo desde a América Central até a Argentina. Pertence a classe Actinopterygii, ordem Characiformes e família Erythrinidae (SANTOS, 1981).

É um peixe que prefere viver em águas paradas ou de pouca correnteza, nas margens ou em pequenas profundidades, sobre fundos de lama e em áreas abrigadas por vegetação aquática. É frequentemente encontrada nas margens alagadas dos rios nas poças dos brejos e nas represas, conseguindo sobreviver em coleções de água muito restritas (PAIVA, 1972).

Quanto à alimentação, quando adulta, é essencialmente piscívora. Em acordo com esse regime alimentar, o seu aparelho digestivo apresenta os mesmos caracteres adaptativos de todo carnívoro: estômago de tamanho médio com paredes musculosas não muito reforçadas e com uma única cavidade e intestino curto (AZEVEDO E GOMES 1943).

É conhecido que a traíra (Figura 1) tem um poder extraordinário de adaptação, sendo capaz de resistir às condições mais adversas. Os adultos têm hábitos sedentários e quando habitam ambientes restritos e sob a ameaça de secarem, mergulham na lama, resistindo enquanto esta não começa a endurecer. Além disto, a resistência ao jejum é excepcional (PAIVA, 1972).



FONTE: Sônia Regina Grötzner.

**FIGURA 1.** Exemplar de traíra – *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794).

### 1.9. BIOMARCADORES

A utilização de biomarcadores para o monitoramento da qualidade ambiental e da saúde dos organismos que habitam ecossistemas poluídos tem sido uma prática constante nos últimos anos (LOPES et al., 2001). Os biomarcadores são usados para demonstrar os efeitos da exposição aos contaminantes ambientais, e seu emprego vem sendo discutido em conjunto com a avaliação de risco ambiental (VAN DER OOST et al., 2002).

O monitoramento dos efeitos biológicos tem sido recentemente um componente integral dos programas de monitoramento ambiental incrementando os métodos, mais comumente usados. Durante anos, muitos biomarcadores têm sido muito eficientes em provar com antecedência os efeitos deletérios nos



sistemas biológicos estimando os efeitos causados pelos contaminantes (LAM E GRAY, 2003).

Há muitas definições para biomarcadores. Tipicamente os biomarcadores são definidos como medidas quantitativas de mudanças nos sistemas biológicos os quais respondem à exposição e/ou a doses de xenobióticos. O uso do termo “biomarcador” é restrito a mudanças celulares, bioquímicas, molecular, fisiológica, fluidos corporais, tecidos e órgãos no organismo e são indicativos de exposição à xenobióticos e seus efeitos (LAM E GRAY, 2003).

Os marcadores de bioacumulação em peixes podem ser aplicados em ordem para elucidar o comportamento aquático dos contaminantes ambientais, como a bioconcentração e identificação de certas substâncias que são encontradas em baixos níveis na água avaliando a exposição dos organismos aquáticos. O uso dos métodos de biomonitoramento como estratégia de controle para a poluição química tem várias vantagens sobre o monitoramento químico, pois muitas das formas de avaliação biológica são o único caminho para integrar os efeitos em um grande número de indivíduos e os processos de interação dos organismos aquáticos (VAN DER OOST et al., 2002).

Os organismos possuem uma grande variedade de mecanismos que os protegem dos efeitos tóxicos dos metais pesados e outros xenobióticos que podem levar a um estresse oxidativo celular (BASHA E RANI, 2003).

O uso de biomarcadores bioquímicos como catalase, glutathione-S-transferase, lipoperoxidação (LPO) e colinesterase têm sido descritos na literatura para verificação dos danos causados por diversos contaminantes (MARIA et al., 2004; COMPANY et al., 2004; AHMAD et al., 2006; LIAO et al., 2006).

#### 1.9.1. Peroxidação lipídica

A peroxidação lipídica é o processo através do qual as espécies reativas de oxibênio (ROS) atacam os ácidos graxos polinsaturados dos fosfolípidos das membranas das células provocando danos à organização das mesmas,

(HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1989), resultando nas seguintes ações deletérias dos peróxidos lipídicos:

- Ruptura das membranas celulares (bombas Na/K e Ca/Mg);
- Mutações do DNA - ácido desoxiribonucléico;
- Oxidação dos lipídeos insaturados;
- Formação de resíduos químicos como o malondialdeído;
- Comprometimento dos componentes da matriz extracelular, proteoglicanos, colágeno e elastina.

As membranas das células e organelas contêm grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados. A fluidez da membrana deve-se à presença de cadeias insaturadas dos fosfolipídios e do colesterol distribuído nas monocamadas lipídicas e danos nesta estrutura tendem a diminuir a fluidez da membrana. O ataque de algumas espécies reativas que retiram átomos de hidrogênio do grupo metileno das cadeias de ácidos graxos polinsaturados, constitui na verdade o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL E GUTTERIDGE, 1991).

Poluentes que induzem LPO têm sido observados em várias espécies de peixes (RADI E MATKOVICS, 1985; RADI E MATKOVICS, 1988). O nível de LPO difere com a espécie, essa diferença é atribuída principalmente às diferenças nos mecanismos antioxidantes (AHAMAD et al., 2000).

#### 1.9.2. Catalase

A catalase é uma das principais enzimas de muitos organismos. Nos mamíferos ela está presente nos peroxissomos, onde catalisa a desmutação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio molecular. A catalase também tem a função de detoxificar diferentes substratos como fenóis e álcoois acoplado a redução do peróxido de hidrogênio (NORDBERG E ARNÉR, 2001).

Os metais pesados promovem danos oxidativos, aumentando diretamente a concentração de espécies reativas de oxigênio e levando a redução da capacidade antioxidante celular (PINTO et al., 2003). Nos tecidos



de peixes especificamente o fígado e rins estão bastante envolvidos no sistema de defesa antioxidante dos quais a catalase faz parte, protegendo contra o estresse oxidativo causado pelos metais (BASHA E RANI, 2003).

A Catalase é o antioxidante primário que elimina o peróxido de hidrogênio ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ), que é uma espécie de radical de oxigênio não reativo que pode penetrar em diversas membranas biológicas e diretamente inativar diversas enzimas. Várias respostas da atividade da Catalase têm sido observadas em animais expostos a contaminantes orgânicos e metálicos. Alguns autores têm observado a indução da Catalase por metais dependendo da dose e do tempo de exposição (ROMEO et al., 2000; SANCHEZ et al., 2005).

#### 1.9.3. GST (Glutathione-S-transferase)

A Glutathione-S-transferase é uma superfamília de enzimas com atividade de detoxificação, que pode ser expressa através de varias isoenzimas. A atividade das GSTs está relacionada à hidroperóxidos lipídicos gerados por poluentes como metais pesados e contaminantes orgânicos (Palace et al., 1996; Tjalkens et al., 1998). Um aumento na atividade da GST foi observado em estudos desenvolvidos por Lopes et al., (2001) com populações de peixes que apresentavam altas concentrações de Cu (cobre) e Se (selênio) nos tecidos. O autor concluiu que há uma constante adaptação metabólica relacionada à atividade da GST e os níveis de contaminantes.

Além disso, a GST é uma importante enzima hepática que atua na degradação de hormônios esteróides. Sua atividade está relacionada também à fisiologia dos peixes, no desenvolvimento do estágio gonadal e na alimentação (BALDWIN E LEBLANC et al., 1994).

#### 1.9.4. Acetilcolinesterase

A acetilcolina (ACh) é um dos principais neurotransmissores do sistema nervoso autônomo. É encontrada em gânglios, junções neuroefetoras parassimpáticas e neuromusculares somáticas, na medula adrenal e também

no sistema nervoso central. Uma vez liberada na fenda sináptica a ACh interage com receptores exercendo seus efeitos fisiológicos (ADAMS, 1992).

A AChE (acetilcolinesterase) catalisa a hidrólise da acetilcolina, que é então transformada em colina e acetato, com a liberação de um próton. A hidrólise ocorre tão logo o neurotransmissor tenha cumprido o seu papel, ou seja, ligar-se ao receptor nicotínico da membrana pós sináptica permitindo a sua abertura, a entrada de íons  $\text{Na}^{+2}$  e a despolarização da membrana, o que irá propagar o potencial de ação subsequente (STURM et al., 1999).

A acetilcolinesterase (AChE) tem importante papel na transmissão dos impulsos nervosos, e sua inibição causa acumulação da acetilcolina nas sinapses e junções neuromusculares o que pode levar a disfunção no nervo e morte do organismo (ROEX et al., 2003; VARO et al., 2003).

Existem dois grupos de proteínas homólogas denominadas genericamente como colinesterases (ChEs): a acetilcolinesterase (AChE) e a butirilcolinesterase (BChE) também conhecida como pseudo-colinesterase, ou colinesterase não específica (STURM et al., 1999). A butirilcolinesterase é descrita como presente no soro, fígado, músculo e outros tecidos (MONTEIROA et al., 2005).

Devido à afinidade do Hg pelos grupamentos sulfidrilas das proteínas, os compostos mercuriais podem induzir mudanças conformacionais nas colinesterases. Adicionalmente o Hg pode destruir as células anticolinérgicas. Ambos os resultados da ação do Hg podem alterar a liberação da ACh e subsequentemente resultar em doenças do sistema nervoso nos organismos (GRIPPO E HEATH, 2003).

#### 1.10. BIOMARCADOR DE GENOTOXICIDADE

Pode-se conceituar os micronúcleos (MN) como sendo corpúsculos extranucleares formados durante o processo de mitose, os quais são o resultado de fragmentos cromossômicos acêntricos ou de cromossomos inteiros que não

ficaram incluídos em nenhum dos núcleos filhos, originados no processo de divisão celular (ALBERTINI et al., 2000).

O micronúcleo pode ser analisado em diferentes células de peixe. O epitélio branquial é o primeiro a ter contato com os contaminantes na água, tem mostrado uma forte sensibilidade aos efeitos de contaminantes ambientais no que diz respeito à quantidade de MN, mas são relativamente difíceis de serem obtidas. A aplicação do ensaio de MN em hepatócitos de peixe tem limitações devido ao baixo índice mitótico das células do fígado. Sendo assim, o uso de eritrócitos periférico é mais utilizado, pois evita processos complexos e o sacrifício do animal. Adicionalmente os altos níveis mitóticos do tecido hematopoiético proporcionam uma resposta genotóxica rápida, revelando danos cromossômicos no sangue periférico (BOLOGNESI et al., 2006).

Além da contagem de micronúcleo a análise dos eritrócitos de peixes também pode envolver a contagem das alterações morfológicas nucleares. Essas alterações foram descritas e classificadas por CARRASCO et al., (1990) como:

- a) *Blebbbed*: núcleos com uma pequena evaginação da membrana nuclear, parecendo conter eucromatina e heterocromatina (mais escuro). Os tamanhos dessas evaginações situam-se na faixa de pequenas protuberâncias até estruturas completamente circunscritas, semelhantes aos micronúcleos, mas ainda ligadas ao núcleo principal.
- b) *Lobed*: núcleos com evaginações mais largas do que as descritas para os *Blebbbed*. Alguns núcleos apresentam várias destas estruturas.
- c) *Vacuolated*: núcleos que apresentam uma região que lembra os vacúolos no seu interior. Estes “vacúolos” apresentam-se destituídos de qualquer material visível no seu interior.
- d) *Notched*: núcleos que apresentam um corte bem definido em sua forma. Geralmente com uma profundidade apreciável no núcleo. Estes cortes parecem não possuir nenhum material nuclear e parecem ser delimitados pelo envelope nuclear.

A avaliação dos efeitos genotóxicos dos compostos mercuriais nos eritrócitos de várias espécies de peixe tem levado a indução de MN. Várias freqüências de MN foram elevadas em doses-dependente quando comparadas com os controles (AYLLON E GARCIA-VAZQUEZ, 2000; SAWARTZ et al., 2003, PORTO et al., 2005).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar através do uso de biomarcadores os efeitos da exposição crônica ao mercúrio em Traíra (*Hoplias malabaricus*) provenientes da Usina Hidrelétrica de Samuel – Rondônia, impactada pela atividade do garimpo de ouro na região Amazônica.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

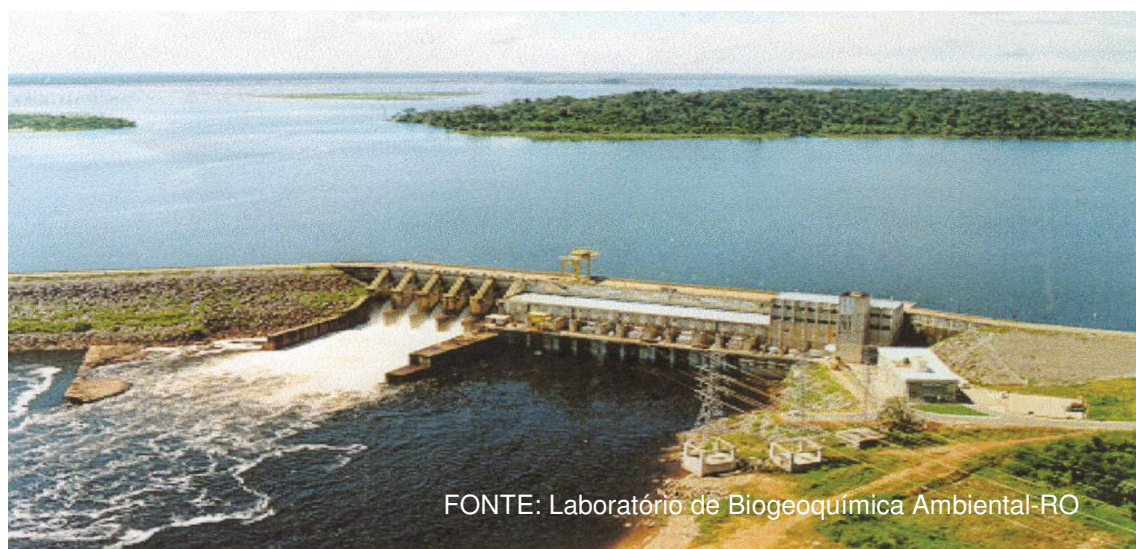
- Verificar o acúmulo de mercúrio total no fígado e músculo de peixes coletados em áreas impactadas pelo garimpo;
- Avaliar a ocorrência de alterações teciduais no fígado e brânquias dos peixes expostos ao mercúrio;
- Avaliar a ocorrência de neurotoxicidade nos exemplares coletados através da medida da atividade da acetilcolinesterase em músculo;
- Avaliar a ocorrência de distúrbios na homeostase celular através marcadores relacionados com o stress oxidativo;
- Analisar através de testes de genotoxicidade possíveis alterações na estrutura e organização do DNA.

### 3. ÁREA DE ESTUDO

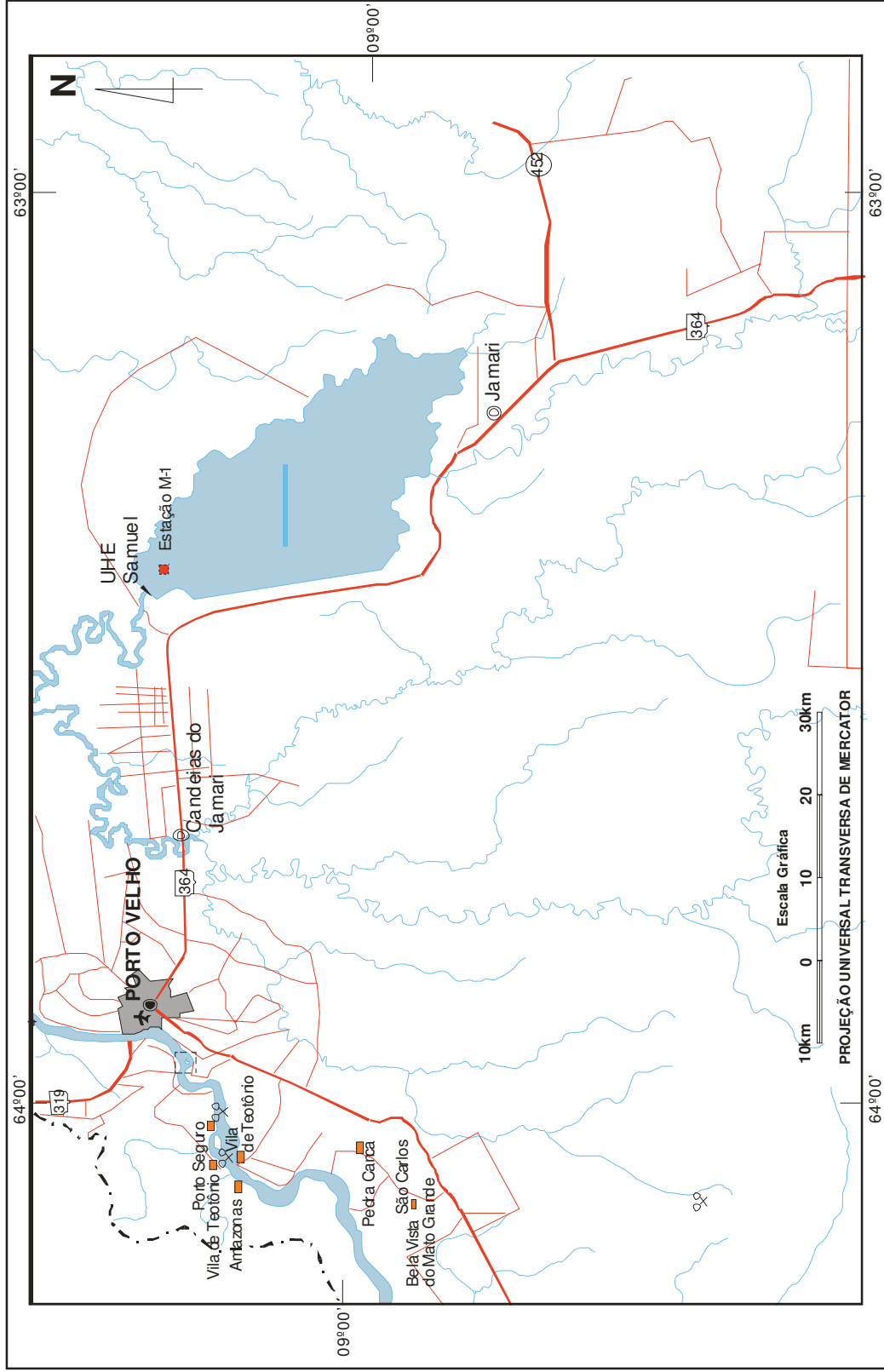
#### 3.1 BACIA HIDROGRÁFICA DO RIO JAMARÍ

O Rio Jamari nasce na Serra do Pacaás Novos 500m de altitude, desembocando na margem direita do Rio Madeira. Possui 560 Km de extensão e drena cerca de 29.700 Km<sup>2</sup>. Seus principais afluentes pela margem direita são os rios Branco, Preto do Crespo e Quatro Cachoeiras e, pela margem esquerda, Massangana e Candeias – principal tributário (dentro do reservatório). Os meses de Junho a Agosto apresentam menor índice pluviométrico, de maior amplitude térmica e de maior insolação. O período de Outubro a Abril é caracterizado como chuvoso (FEARNSSIDE, 2005).

A UHE–Samuel, (Figuras 2 e 3) está localizada no rio Jamari, afluente da margem direita do rio Madeira, no estado de Rondônia, distando 52Km da cidade de Porto Velho, pela rodovia BR–364.



**FIGURA 2.** Usina Hidrelétrica de Samuel (RO).



**FIGURA 3.** Mapa da região de alagamento da Usina Hidrelétrica de Samuel situada no rio Jamari próxima ao município de Porto Velho no estado de Rondônia.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. COLETA E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

Foram realizadas duas coletas na Usina Hidrelétrica de Samuel (UHE) no estado de Rondônia. Uma coleta aconteceu no mês de Agosto e outra em Novembro de 2005. Um total de 27 exemplares da espécie *Hoplias malabaricus* foram coletados.

Para fins comparativos 6 espécimes de *Hoplias malabaricus* foram coletados durante o ano de 2006 no Parque do Costa (PR) uma região não impactada pelo garimpo. Para estes espécimes foram feitas análises dos biomarcadores bioquímicos (GSTs, Catalase, Colinesterase e peroxidação lipídica) e biomarcadores de genotoxicidade (ensaio de micronúcleo).

Os exemplares foram medidos, pesados e identificados quanto ao sexo, e coletadas amostras de sangue, fígado, brânquias e músculo para a realização dos testes descritos abaixo:

#### a) Amostras de Sangue

Foram preparadas 2 lâminas com distensão de sangue extraído da nadadeira anal de cada espécime coletado. As lâminas foram fixadas em Etanol e coradas com Giemsa 10% (CARVALHO, 1994).

As extensões sanguíneas foram utilizadas para a avaliação dos danos genotóxicos causados pelo mercúrio através do teste de micronúcleo que consiste na contagem de 2000 células por lâmina verificando as possíveis alterações nucleares das mesmas.

As alterações nucleares foram identificadas de acordo com Carrasco et al., (1990).

#### b) Amostras de Fígado e Brânquias

As amostras de fígado foram coletadas para análise em Microscopia de Luz (ML), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), bem como para



quantificação dos teores de mercúrio (Hg) por Espectrofotometria de Absorção Atômica de Vapor Frio. Alíquotas de fígado também foram separadas para a avaliação dos biomarcadores bioquímicos (Catalase, Glutathione-S-transferase e Peroxidação lipídica). Já as amostras de brânquias foram coletadas para análise em Microscopia de Luz (ML), Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

A fixação das amostras tanto para Microscopia de Luz como para Microscopia Eletrônica foi realizada no laboratório da UHE-de Samuel (RO), em seguida o material foi transportado para o Laboratório de Toxicologia Celular da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

No Laboratório de Toxicologia Celular (UFPR) as amostras a serem avaliadas por ML foram emblocadas em Paraplast, os cortes histológicos e a preparação das lâminas para Microscopia de Luz foram realizados conforme protocolo de rotina do laboratório. As análises por microscopia de luz foram feitas no microscópio Zeiss (AXIO PHOTO) do setor de Ciências Biológicas da mesma Universidade.

O material para MET foi emblocado em resina plástica Poli-EMBED 812 (Electron Microscopy Sciences©) e em seguida os cortes semifinos e ultrafinos foram realizados e contrastados conforme protocolo de rotina do laboratório. A análise dos cortes foi realizada no Centro de Microscopia Eletrônica da Universidade Federal do Paraná (UFPR) através do Microscópio Eletrônico de Transmissão (JEM JEOL- 1200 EX II).

O segundo arco branquial direito dos peixes foi coletado e fixado para ML, já parte do segundo arco branquial esquerdo foi fixado para Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET), e o restante para Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV). As análises por Microscopia de Varredura foram realizadas no microscópio JEOL JSM – 6360 LV SCANNING ELECTRON.

### c) Amostras de Músculo

Amostras de músculo axial foram coletadas de todos os peixes para a quantificação dos teores de Hg bem como a medição da atividade colinesterásica.

#### 4.2. ANÁLISE DE Hg TOTAL

As amostras de músculo axial e fígado coletadas foram pesadas (peso úmido), e em seguida passaram por uma digestão ácida com ácido sulfúrico e nítrico ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ :  $\text{HNO}_3$ ) em banho-maria a  $60^\circ\text{C}$  até a solubilização completa da amostra. Em seguida as amostras foram resfriadas em banho de gelo e adicionou-se  $\text{KMNO}_4$  a 5%, retornando por 15 min ao banho-maria.

Após o término da digestão as amostras permaneceram em repouso (over night) até o momento da análise onde foram neutralizadas com Hidróxilamina. A determinação das concentrações de Hg foram realizadas no Laboratório de Biogeoquímica Ambiental da Universidade Federal de Rondônia utilizando-se o Espectrofotômetro de Absorção Atômica FIMIS-400 (Flow Injecton Mercury System-Perkin Elmer). Seguindo técnica desenvolvida por BASTOS et al, (1998).

#### 4.3. MICROSCOPIA DE LUZ (ML)

Foram coletados, o fígado e arcos branquiais de cada espécime. Os órgãos foram colocados diretamente em um frasco devidamente identificado contendo solução fixadora ALFAC (Etanol 80% (85 ml), Formol 40% (20 ml) e Ácido Acético Glacial (25 ml)), onde permaneceu por 16 horas até o momento da estocagem em Etanol (70%), (protocolo em anexo).

#### 4.4. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)

O fígado e as brânquias dos exemplares coletados foram fixados em fixador Karnovsky (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4% e Cacodilato 0,1M). O material foi mantido em solução fixadora Karnovsky por duas horas, em seguida realizou-se a lavagem do material com uma solução tampão de cacodilato 0,1M, pH 7.2-7.4 (protocolo em anexo).

#### 4.5. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Coletou-se o segundo arco branquial esquerdo de cada peixe. As brânquias foram colocadas diretamente em solução fixadora (Glutaraldeído 3% e Cacodilato 0,1M pH 7.2-7.4), desidratadas com etanol (Merck®) submetidas ao ponto crítico (CO<sub>2</sub>) e observadas no MEV JEOL JSM-6360LV.

#### 4.6. CONTAGEM DOS CENTROS DE MELANO-MACRÓFAGOS

Após a preparação das lâminas histológicas de fígado, bem como a coloração com hematoxilina eosina, seguindo os protocolos de rotina, realizou-se a contagem dos centros de melano-macrófagos (CMMs) e melano-macrófagos livres (MMs).

Os melano-macrófagos e macrófagos livres foram contados através de um sistema teste quadriculado acoplado a uma das oculares do microscópio, cuja área era de 1mm<sup>2</sup> onde cada quadrado media 0,1mm<sup>2</sup>. Foram analisados 10 campos escolhidos aleatoriamente em 27 lâminas de fígado. O número de melano-macrófagos livres foi considerado de duas a quatro células pigmentadas e os centros de melano-macrófagos os que continham cinco ou mais células pigmentadas. Os resultados da contagem dos melano-macrófagos foram apresentados por mm<sup>2</sup>.

Toda a metodologia utilizada para esta análise está descrita na literatura por Rabitto et al.; (2005).

#### 4.7. ATIVIDADE COLINESTERÁSICA

A atividade colinesterásica do músculo foi determinada segundo o método de Ellmann et al.; (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). Para a quantificação protéica (proteína total) foi utilizado também o método de Bradford (1976), adaptado por Silva de Assis (1998).

#### 4.8. BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

Alíquotas de fígado dos exemplares coletados foram devidamente separadas e armazenadas em recipientes devidamente identificados, sendo as mesmas mantidas em gelo seco até posterior congelamento em freezer -80°C onde permaneceram até o momento da análise. Todos os protocolos para a realização das análises bioquímicas encontram-se em anexo.

##### 4.8.1. Análise da catalase

Para a análise as amostras de fígado foram descongeladas em banho de gelo moído e em seguida pesadas (~0,100g de tecido). Após a pesagem foi feito à homogeneização das mesmas em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. Os homogeneizados foram transferidos para eppendorf de 2ml e centrifugados por 10 min a 4°C a 10000g. O sobrenadante foi retirado e utilizado para a determinação da atividade da catalase segundo AEBI (1984).

A determinação da atividade da enzima foi feita no espectrofotômetro (Espectrofotômetro Ultrospec 4300 pro) com a utilização da cubeta de quartzo. O princípio do método parte do decréscimo da absorbância a 240 nm devido à degradação do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ).

##### 4.8.2. Análise da Glutathione -S-Transferase (GST)

Nesse procedimento a GST catalisa a reação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com o GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância a 340nm no espectrofotômetro de microplaca (SUNRISE/TECCAN).

Primeiramente as amostras de fígado foram pesadas, e em seguida homogeneizadas em tampão fosfato 0,1M, pH 6,5. As amostras foram centrifugadas por 10 min a 4°C a 10000g. O sobrenadante de cada amostra foi retirado e utilizado para a análise seguindo o método descrito por KEEN et al., 1976.

#### 4.8.3. Análise da peroxidação lipídica (LPO)

Amostras de fígado foram descongeladas em banho de gelo, e em seguida pesadas (0,200-0,300g) tirando-se o excesso de sangue.

Após a pesagem as amostras foram homogeneizadas em água e etanol 30% e em seguida sonicadas por 2 min. Os homogeneizados foram colocados em eppendorfs de 2ml, 300µl do homogenato e 1500µl do meio de reação. As amostras foram incubadas por 30 min na temperatura ambiente e sequencialmente centrifugadas. Depois da centrifugação o sobrenadante de cada amostra foi pipetado em microplaca e a leitura no espectrofotômetro (SUNRISE/TECCAN), foi feita a 570 nm (JIANG et al., 1992).

#### 4.8.4 Quantificação protéica

Ao término de todas as análises bioquímicas realizadas (GST, Catalase e LPO) foi feita a quantificação protéica (proteína total) utilizando o método de Bradford (1976), adaptado por Silva de Assis (1998). Alíquotas padronizadas de amostras de fígado diluídas em tampão fosfato (0,1M, pH 6,5) foram pipetadas em uma microplaca. Em seguida, foi adicionado 250 µl de reagente de Bradford diluído (Bio Rad®). A absorbância das amostras foi verificada a 650 nm. Os valores finais da quantificação colorimétrica foram obtidos em miligramas de proteína por mililitro de amostra, utilizando-se uma curva padrão pré-estabelecida com diferentes concentrações conhecidas de soro de albumina bovina (BSA)

#### 4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises bioquímicas (Catalase, Glutathione-S-transferase, Peroxidação Lipídica), atividade colinesterásica e concentrações de mercúrio foi feita a correlação entre os valores analíticos encontrados e as variáveis, peso e comprimento dos espécimes de peixe (*Hoplias malabaricus*).

O teste de correlação utilizado foi o de Pairwise que compara médias Log transformadas.

## 5. RESULTADOS

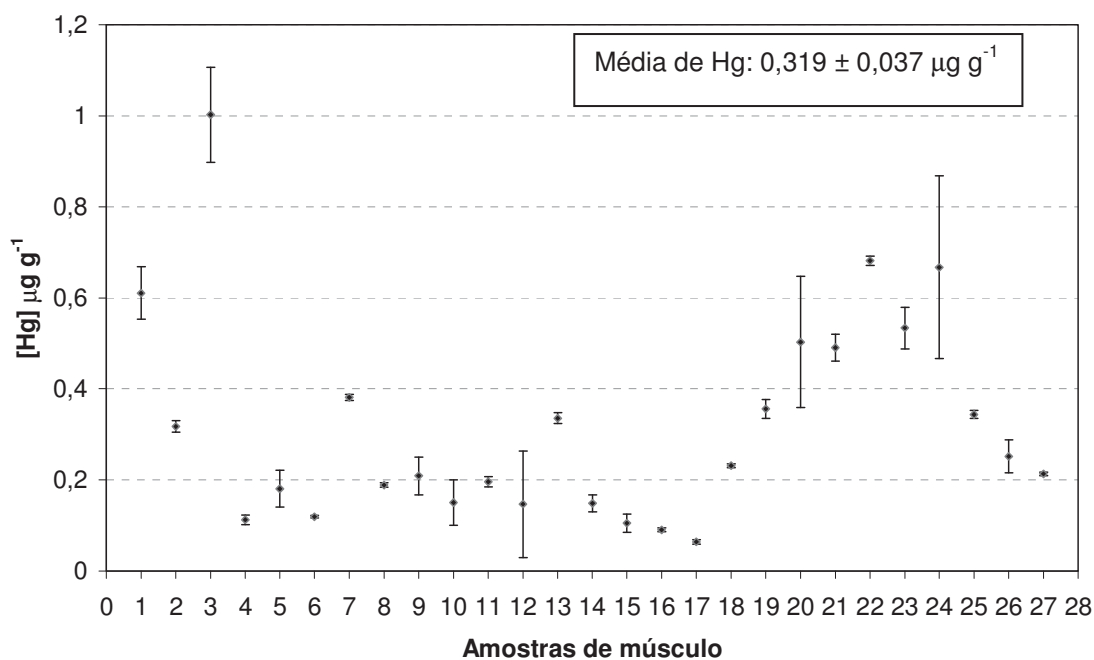
Foram coletados 27 exemplares de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) na UHE-Samuel no Rio Jamarí (RO), (Tabela 1). Os peixes tiveram uma média de peso e comprimento respectivamente de 557,77 g (160 – 880 g) e 35 cm (24 – 42 cm).

Pela falta de valores de referência na região Amazônia, até mesmo pela questão da logística, para fins comparativos foram coletados 6 exemplares de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) no Parque do Costa (PR), uma região sem histórico de atividade garimpeira.

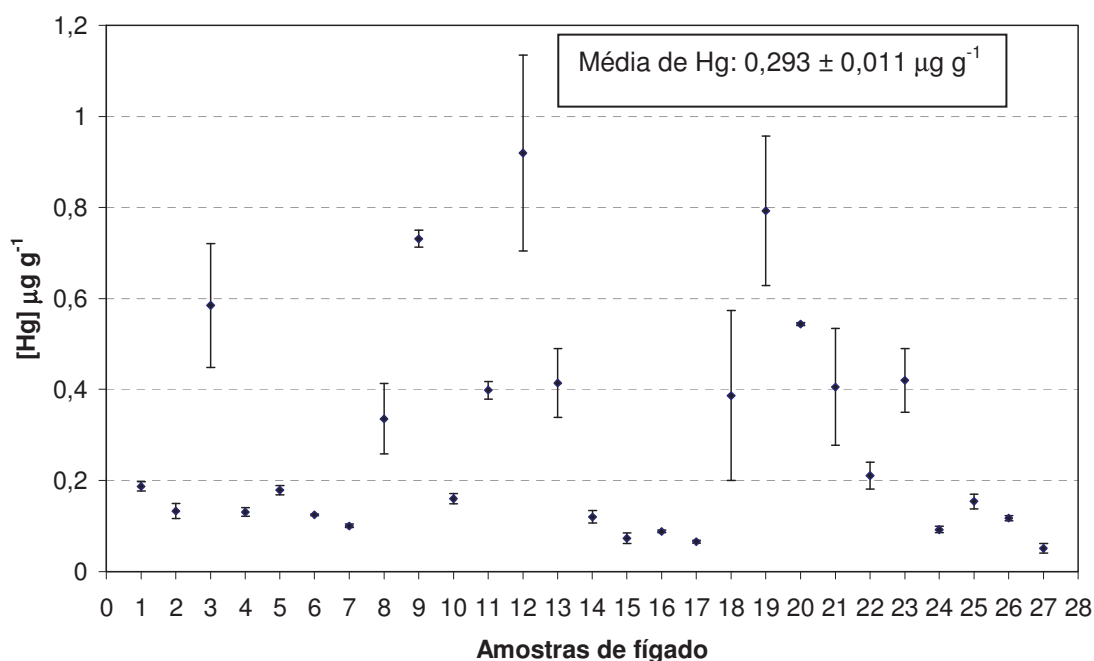
**TABELA 1.** Dados de comprimento (cm) e peso (g) de cada espécime de peixe (*Hoplias malabaricus*) coletado entre os meses de Agosto e Novembro de 2005.

Espécime	Comprimento (cm)	Massa (g)	Sexo
1	38	660	Fêmea
2	41	800	Macho
3	42	880	Não determinado
4	35	540	Macho
5	38	680	Fêmea
6	41	820	Macho
7	28	690	Fêmea
8	34	500	Fêmea
9	39	650	Não determinado
10	39	680	Macho
11	32	340	Fêmea
12	39	500	Fêmea
13	40	640	Macho
14	36	600	Fêmea
15	24	160	Macho
16	28	220	Macho
17	27	190	Macho
18	39,5	700	Macho
19	38	720	Fêmea
20	40	850	Fêmea
21	40,5	600	Macho
22	32	420	Macho
23	35	520	Macho
24	32	650	Fêmea
25	31	400	Fêmea
26	30	400	Fêmea
27	26	250	Macho

### 5.1. ANÁLISE QUÍMICA DE MERCÚRIO



**FIGURA 4.** Concentração de mercúrio total em músculo axial dos 27 espécimes de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados na UHE de Samuel (RO).



**FIGURA 5.** Concentração de mercúrio total no fígado de cada espécime de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletado na UHE de Samuel (RO).

Na avaliação das concentrações de Hg em músculo (Figura 4) observou-se uma média de  $0,319 \pm 0,037 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg sendo a menor e a maior

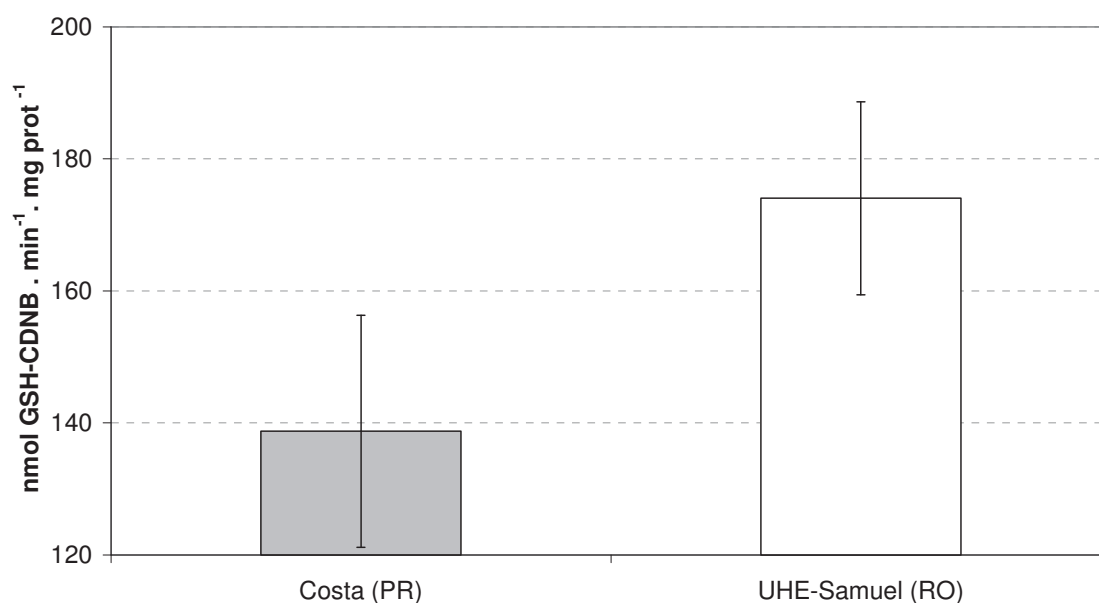


concentração encontrada respectivamente de  $0,063 \pm 0,005$  –  $1,002 \pm 0,104 \mu\text{g g}^{-1}$ . Dos valores médios de mercúrio encontrados 18,5% ultrapassaram a concentração máxima sugerida pela Organização Mundial de Saúde (WHO) que é de  $0,5 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg para o consumo humano.

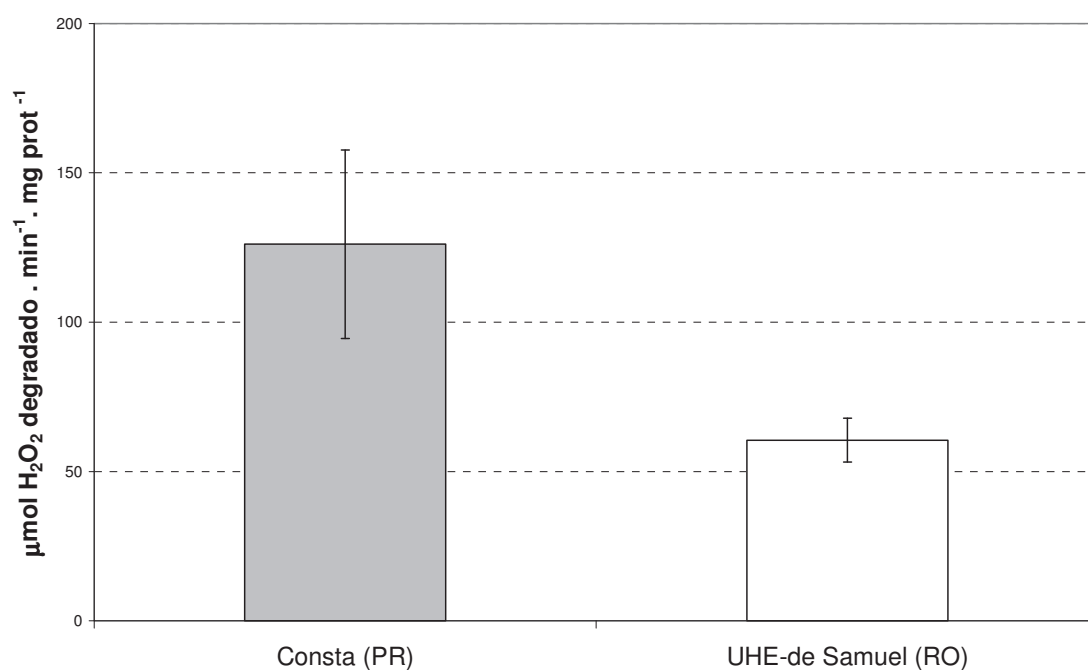
Houve correlação entre o peso e as concentrações de mercúrio no músculo considerando  $p < 0,05$  ( $p < 0,0042$ ), já entre o comprimento e as concentrações de mercúrio no músculo não houve correlação.

No fígado (Figura 5), a concentração média de Hg foi de  $0,293 \pm 0,011 \mu\text{g g}^{-1}$  com intervalo de ( $0,050 \pm 0,010$  –  $0,919 \pm 0,215 \mu\text{g g}^{-1}$ ), havendo correlação entre o peso do fígado e as concentrações de mercúrio do mesmo ( $p < 0,01$ ).

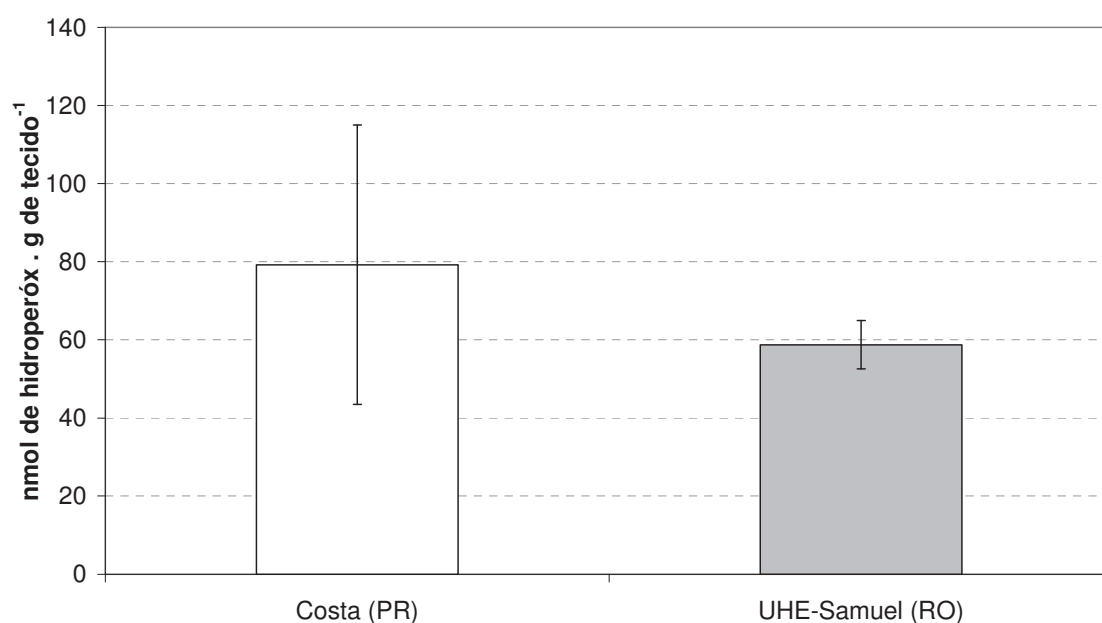
## 5.2. ANÁLISE DOS BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS



**FIGURA 6.** Atividade comparativa entre os valores das GSTs encontrados em fígado de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) provenientes do Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO).



**FIGURA 7.** Comparação entre a atividade da Catalase em fígado de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados no Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO).



**FIGURA 8.** Peroxidação lipídica em fígado de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados no Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO).

Com exceção do Rio Negro, todos os rios Amazônicos têm um histórico de contaminação por mercúrio (DÓREA et al., 2003). Para fins comparativos com os dados encontrados no Reservatório de Samuel, análises bioquímicas

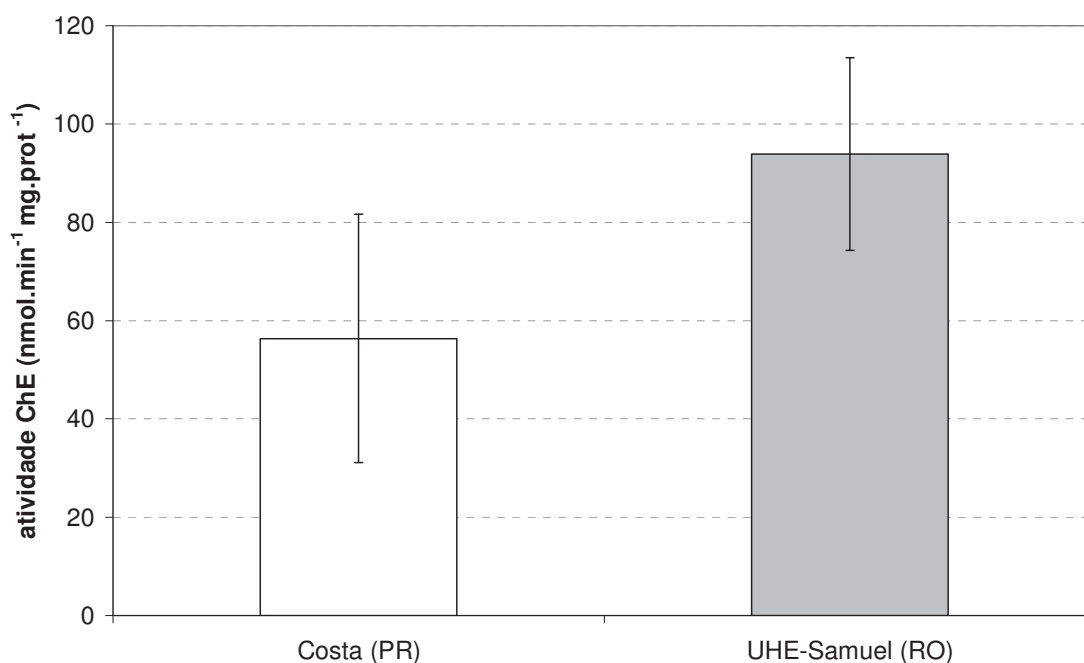
do fígado de seis peixes da espécie *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) de uma área, (Parque do Costa - PR) que não tem histórico de contaminação por mercúrio foi realizada.

No presente estudo foram avaliadas as atividades antioxidantes das enzimas Catalase, Glutathione S-transferase e antioxidante não enzimático que causa dano peroxidativos (LPO).

Não houve diferença significativa na atividade enzimática dos marcadores bioquímicos (GSTs, Catalase e Peroxidação lipídica), quando feita a comparação entre os peixes do Parque Costa e os do Reservatório de Samuel (Figuras 6, 7 e 8).

Quando comparadas às concentrações de Hg no fígado com a atividade das GSTs ( $p < 0,16$ ), Catalase ( $p < 0,30$ ) e Peroxidação lipídica ( $p < 0,17$ ), respectivamente, não houve diferença significativa considerando os valores de  $p < 0,05$ .

### 5.3. ATIVIDADE DA COLINESTERASE

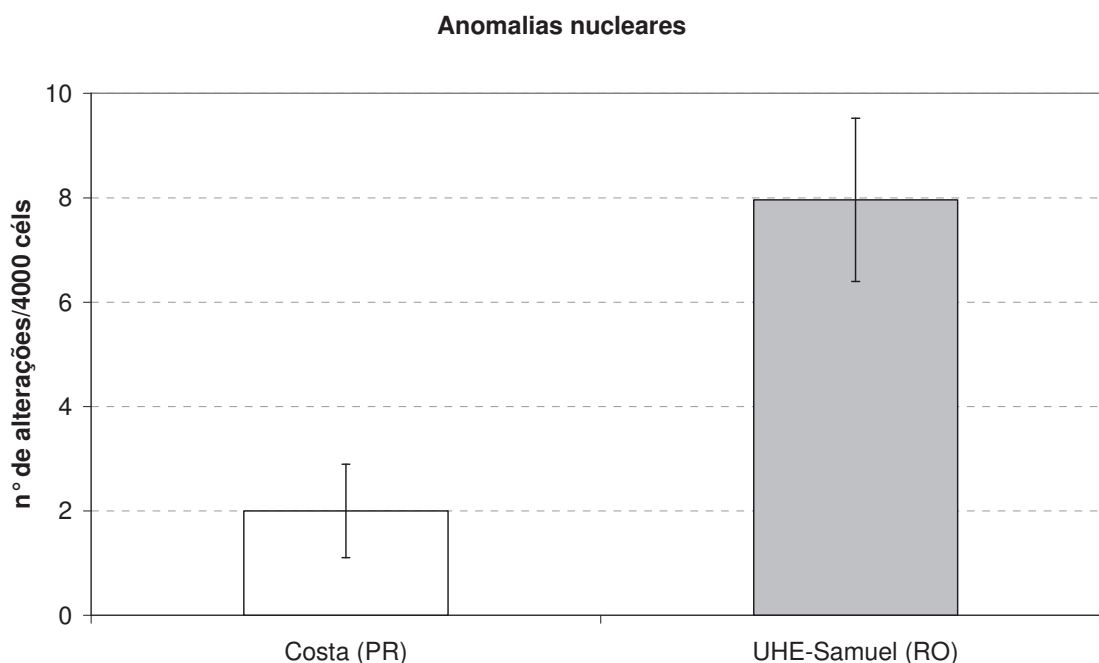


**FIGURA 9.** Comparação entre a atividade da colinesterase (ChE) em músculo axial de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados no Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO).

As médias e os desvios padrão da atividade colinesterásica no músculo de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) no Parque do Costa e na UHE de Samuel foram respectivamente  $56,39 \pm 49,82$  e  $93,86 \pm 111,52$  nmol min<sup>-1</sup> mg prot.<sup>-1</sup> respectivamente.

Na comparação feita entre a atividade colinesterásica no músculo dos peixes do Parque do Costa e da UHE de Samuel não houve diferença significativa ( $p < 0,26$ ). Também não houve diferença significativa entre as concentrações de Hg no músculo e a atividade da ChE ( $p < 0,69$ ).

#### 5.4. BIMARCADORES DE GENOTOXICIDADE



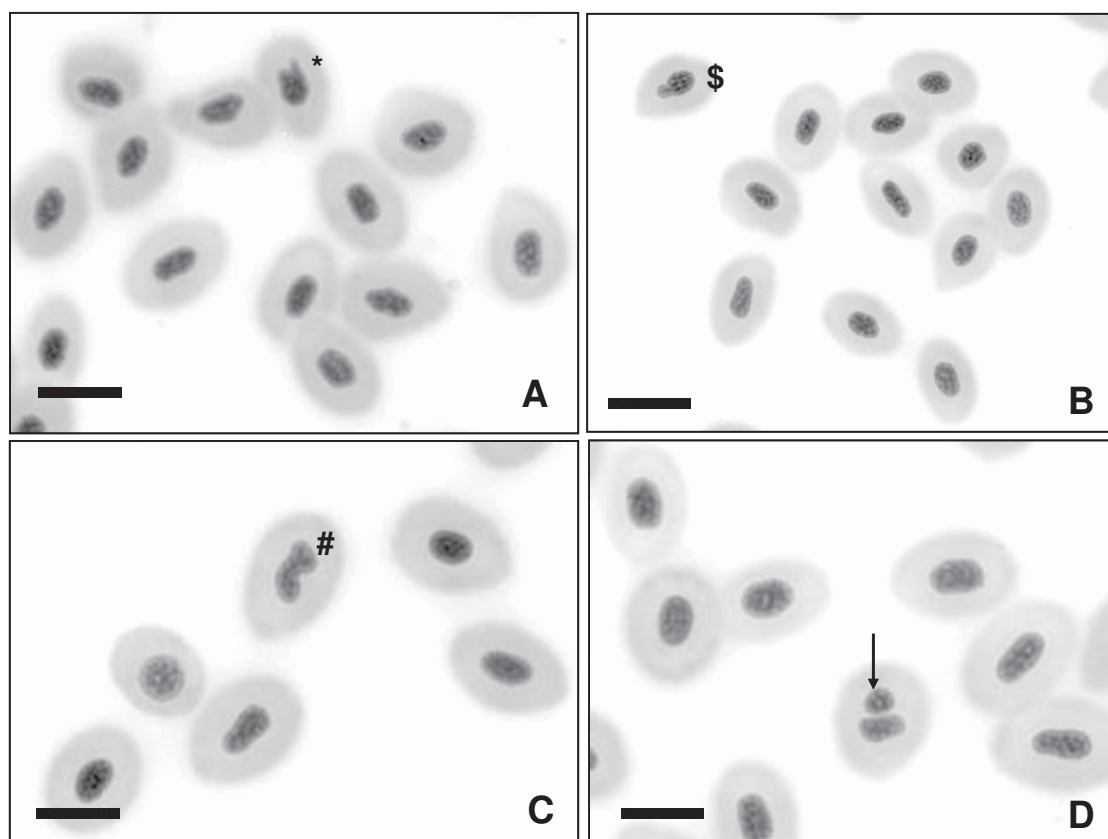
**FIGURA 10.** Comparação entre a presença de anomalias nucleares em eritrócito de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados no Parque do Costa (PR) e UHE-de Samuel (RO).

Houve a ocorrência de um micronúcleo na contagem dos eritrócitos de peixe (4000 céls). Durante a contagem foram computadas as anomalias nucleares observadas, que foram classificadas de acordo com a descrição de Carrasco et al.; (1990).

Uma média de 7,96 anomalias nucleares foi encontrada para 4000 eritrócitos de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) da UHE-Samuel. No Costa foi

observada uma média de 2,83 anomalias nucleares nos eritrócitos dos peixes (Figura 8).

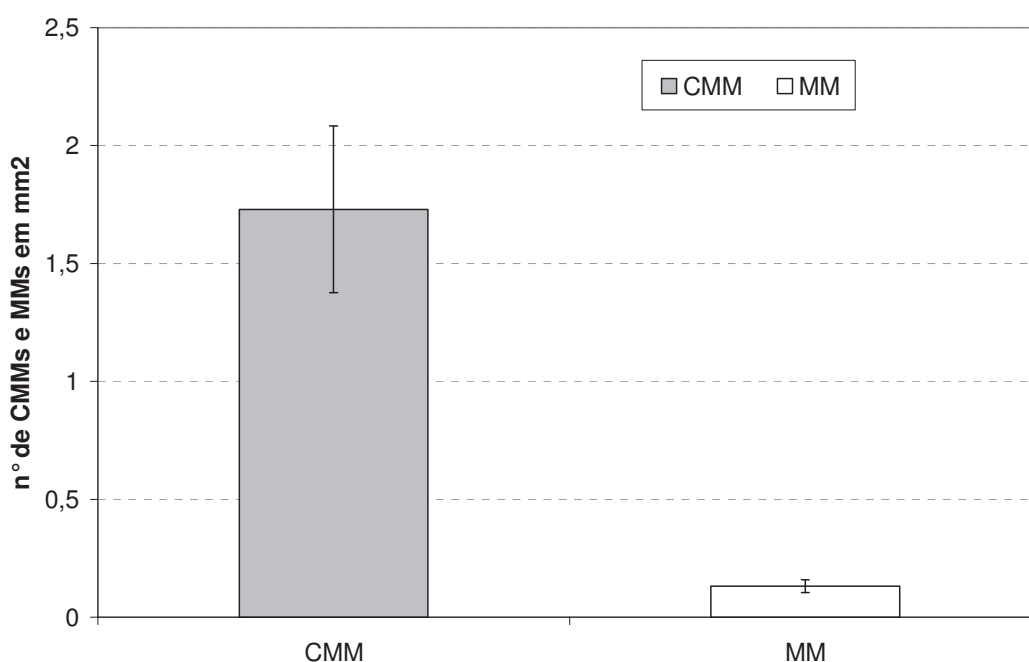
Uma diferença significativa ( $p < 0,037$ ), na comparação das médias de anomalias nucleares entre a UHE-Samuel e o Costa foi observada considerando  $p < 0,05$ .



**FIGURA 11.** Anomalias nucleares observadas nos esfregaços sanguíneos de *Hoplias malabaricus* coletados na UHE-de Samuel (RO). A – Blebbed (\*). B – Noched (\$). C – Noched (#). D – Micronúcleo (→). Escala: (20 $\mu$ m).

### 5.5. CONTAGEM DOS CENTROS DE MELANO-MACRÓFAGOS

Todas as amostras de fígado dos espécimes de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel analisados (Figura 12), apresentaram centros de melanomacrófagos (CMMs) e melanomacrófagos (MMS) bem evidentes assim como foi observado no trabalho realizado por Mela (2004).



**FIGURA 12.** Contagem dos centros de melano-macrófagos (CMM) e melano-macrófagos (MM) livres presentes nos cortes histológicos do fígado de *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) coletados na UHE-de Samuel (RO).

### 5.6. ALTERAÇÕES TECIDUAIS E ULTRAESTRUTURAIS DE BRÂNQUIAS E FÍGADO DE *H. malabaricus*

Através das avaliações histopatológicas por microscopia de luz, varias alterações estruturais foram observadas no tecido hepático e brânquias. Todas as amostras de fígado apresentaram focos de necrose e presença de melano macrófagos. Alterações como infiltração leucocitária e vacuolização também foram observadas (Tabela 2). Nas brânquias houve grande incidência de

proliferação celular, aneurismas e fusão lamelar. Houve uma pequena incidência de parasitas (Tabela 3).

**TABELA 2.** Avaliação histopatológica de fígado por Microscopia de Luz em *H. malabaricus* coletadas na UHE-de Samuel (RO).

Amostras de fígado	Infiltração Leucocitária	Vacuolização	Neoplasia	Necrose
1	P	A	P	P
2	P	P	P	P
3	P	A	P	A
4	A	P	A	P
5	P	A	A	P
6	P	P	A	P
7	P	P	A	P
8	A	P	A	P
9	A	P	A	P
10	P	P	A	P
11	P	A	P	P
12	A	P	A	P
13	P	P	A	P
14	P	P	A	P
15	A	A	A	P
16	P	A	A	P
17	A	A	A	P
18	P	A	A	A
19	P	A	A	P
20	A	P	A	P
21	A	P	A	P
22	A	P	A	P
23	P	P	P	P
24	P	A	A	P
25	P	P	A	P
26	P	P	A	P
27	P	A	A	P

\*P(Presença)/ A (Ausência).

**TABELA 3.** Avaliação histopatológica de brânquias por Microscopia de Luz em *H. malabaricus* coletadas na UHE-de Samuel (RO).

Amostras de Brânquias	Aneurisma	Fusão lamelar	Neoplasia	Parasita
1	A	P	P	P
2	A	A	P	P
3	A	A	P	A
4	A	P	P	P
5	A	A	A	A
6	A	A	P	A
7	P	P	A	P
8	A	P	P	A
9	A	A	A	A
10	A	P	A	A
11	A	A	A	P
12	P	A	A	A
13	A	P	A	P
14	A	P	A	A
15	A	P	A	P
16	P	A	P	A
17	P	A	P	A
18	P	A	A	A
19	A	P	A	A
20	P	P	P	A
21	P	P	P	A
22	P	P	A	A
23	P	P	A	A
24	P	P	A	A
25	P	P	A	P
26	P	P	A	A
27	A	P	A	A

\* P (Presença)/ A (Ausência).

As alterações estruturais no fígado e brânquias foram confirmadas com as avaliações ultraestruturais através da Microscopia Eletrônica de Transmissão.

Os resultados de morfologia mostram a organização tecidual e ultraestrutural da lamela secundária da brânquia de *H. malabaricus*, onde são encontradas as lesões mais comuns nestas estruturas em peixes expostos a poluentes dissolvidos na água. Na figura 16 destaca-se um tipo celular, a célula Pilar, com papel importante na formação dos capilares sanguíneos, separando os mesmos e auxiliando na sua formação juntamente com as células endoteliais na lamela secundária. Dentro dos vasos é observada a presença de eritrócitos e glóbulos brancos. Lesões nas células Pilar, como encontrado nas figuras 16 e 17, bem como nas células epiteliais promovem alterações na



estrutura da lamela podendo contribuir para formação de aneurismas como observado nas figuras 13E, 13F e figura 15B. Aneurismas são dilatações de capilares sanguíneos nas extremidades das lamelas secundárias. O epitélio da lamela secundária aparece alterado apresentando projeções celulares irregulares (Figura 17) bem como lesões citoplasmáticas que mostram uma completa desorganização interna da célula (Figura 17C). Nas figuras 16 e 17 é observada a ocorrência atípica de células de cloro no epitélio da lamela secundária.

Alterações morfológicas nas brânquias de *H. malabaricus* também foram observadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura e Microscopia de luz. A disposição das lamelas secundárias das brânquias de *H. malabaricus* é observada na figura 13A. Nas figuras 13B, 15A observam-se formações neoplásicas. A fusão das lamelas secundárias é destacada pelas figuras 13D, 14E e 14F. A proliferação celular entre as lamelas secundárias foi bastante evidente, bem como as alterações no epitélio branquial tanto na Microscopia Eletrônica como na Microscopia de Luz (Figura 14 e Figura 15). Esta proliferação celular certamente causa alterações nas trocas gasosas com o meio hídrico pelo animal, podendo levá-lo a morte. O epitélio branquial muitas vezes apareceu completamente desorganizado, apresentado regiões com fusão das lamelas secundárias como pode ser observado nas figuras 14E e 14F.

Parasitas nas lamelas secundárias são observados na figura 18A e 18B, já na figura 18C o parasita aparece inserido na lamela primária. Os parasitas podem estar contribuindo para o comprometimento das funções branquiais, mas maiores estudos para a caracterização destes precisam ser realizados.

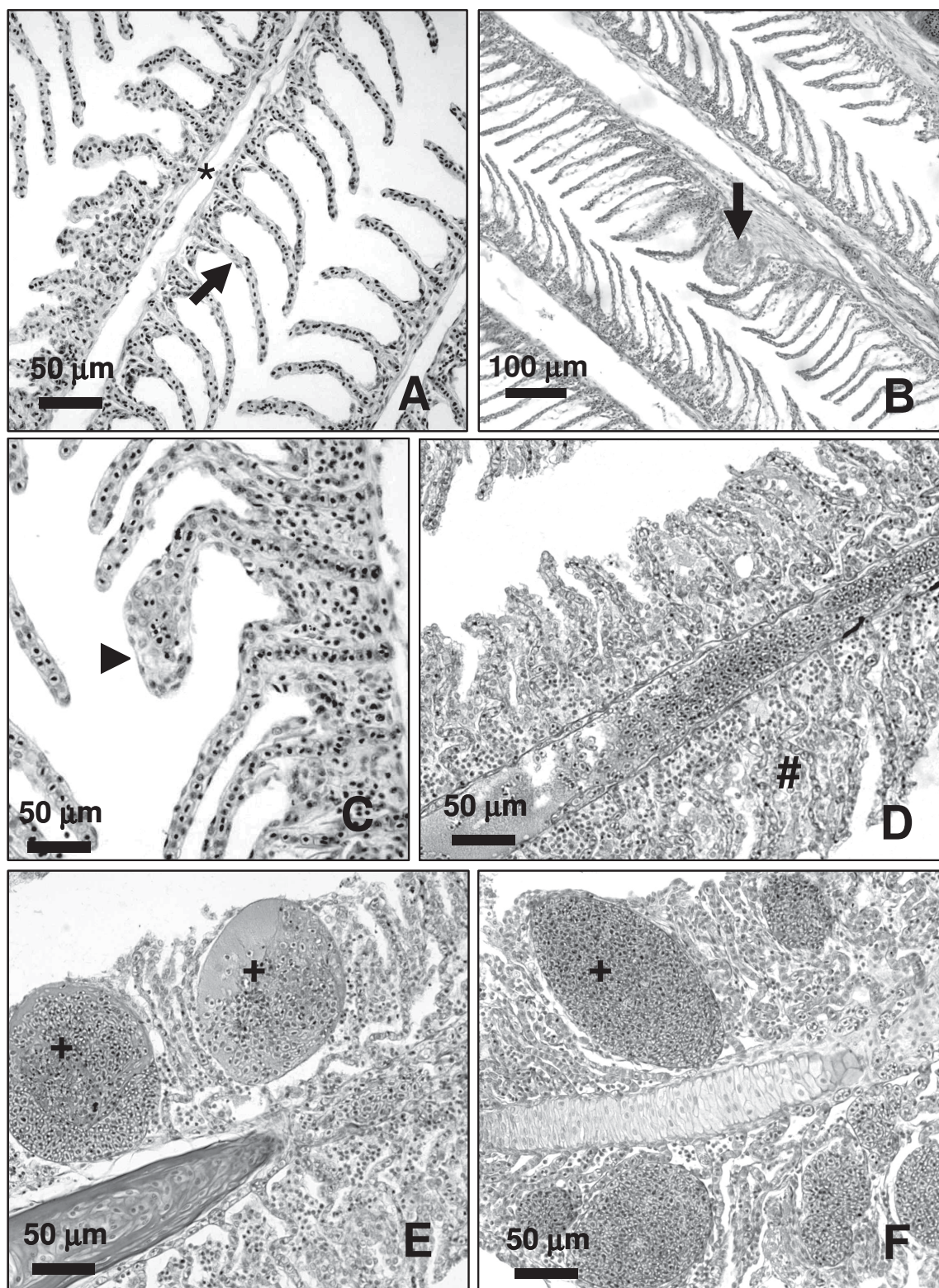
O fígado de *H. malabaricus* é um tecido formado basicamente por células que são denominadas de hepatócitos, células poliédricas com um núcleo, estes se encontram arranjados paralelamente em torno dos sinusóides que são formados por células enfileiradas distribuídas por todo o parênquima hepático (Figura 19A).

Na figura 19B podemos observar uma resposta inflamatória, devido à presença de leucócitos no tecido, o mesmo ocorre na figura 19C onde o

processo inflamatório encontra-se mais avançado com a formação de uma área de necrose; já na figura 19 D observa-se uma área com alta basofilia e desorganização tecidual, o que caracteriza uma futura formação de área de necrose. Nas figuras 19E e 19F ocorrem dois casos atípicos de formação do tecido hepático. As células apresentam baixa acidofilia, e organizadas de maneira diferenciada. A presença de melanomacrófagos foi observada na figura 20. Na figura 20A os melanomacrófagos encontram-se agrupados nas proximidades dos vasos, já nas figuras 20B e 20C próximos a regiões de necroses.

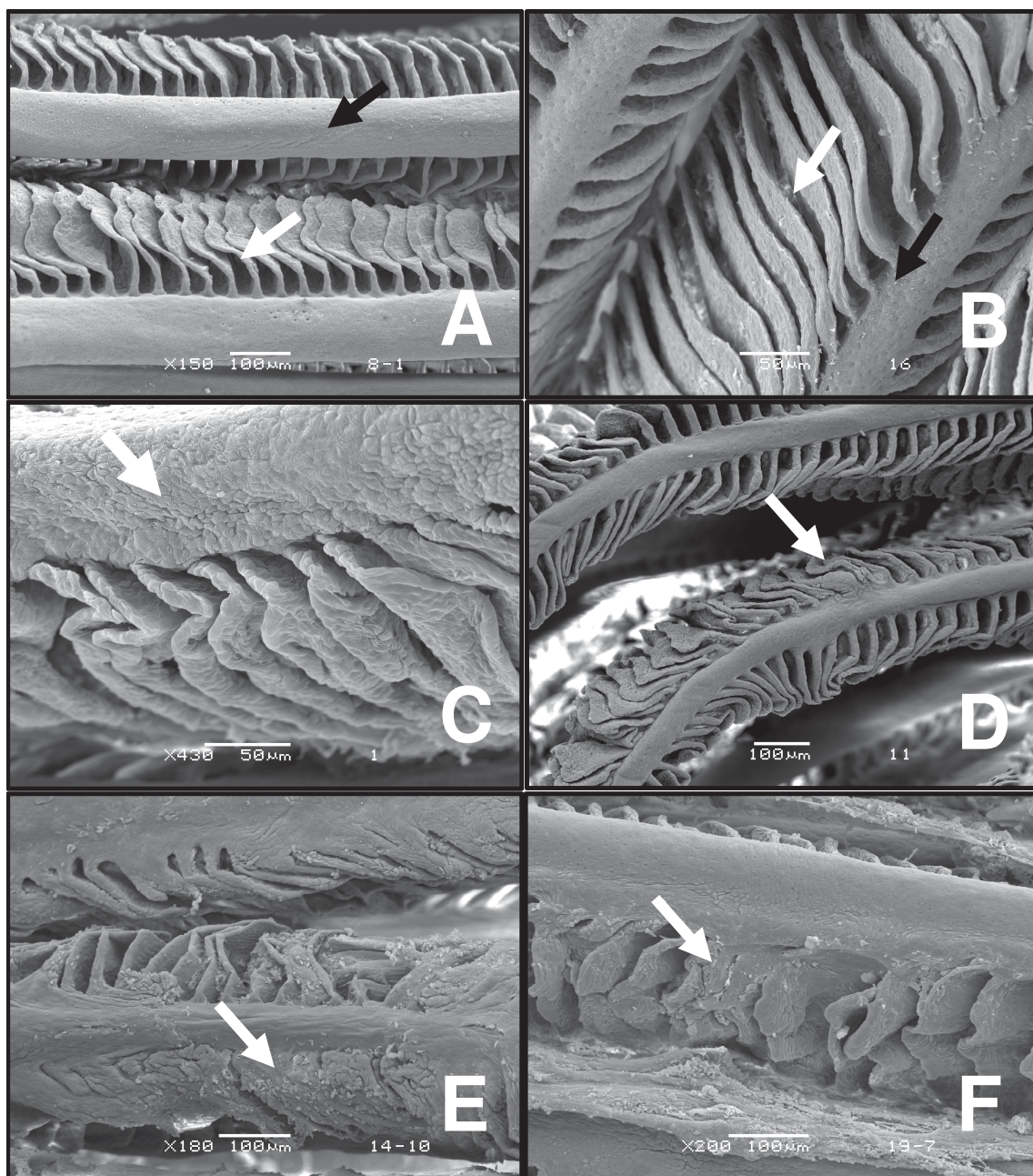
Na organização ultraestrutural dos hepatócitos do tecido hepático de *H. malabaricus*, observamos a esfericidade do núcleo e a disposição do retículo granular paralelo as membranas bem como a presença de mitocôndrias próximas ao núcleo (Figura 21). A distribuição do retículo granular próximo as membranas é característica comum no tecido desta espécie. Outra característica observada no fígado de traíra é a formação de zonas de adesão do tipo desmossomos e presença de canálculos biliares dispostos entre duas células (Figura 21).

Foi observada a perda da esfericidade nuclear do hepatócito (Figura 22A), e áreas eletrodensas foram encontradas no citoplasma (Figura 22B), indicando a possível formação de áreas de necrose com aparente desorganização do retículo granular, que é uma possível consequência da desorganização do citoesqueleto. A desorganização do citoesqueleto também é bastante evidente na figura 24, com as dilatações do retículo endoplasmático grânular. As áreas de necrose foram bastante evidentes no parênquima hepático, bem como a presença de vesículas e inclusões citoplasmáticas (Figuras 22D, 22E e 22F). Grânulos eletrodensos foram encontrados conforme demonstrado pela figura 23.



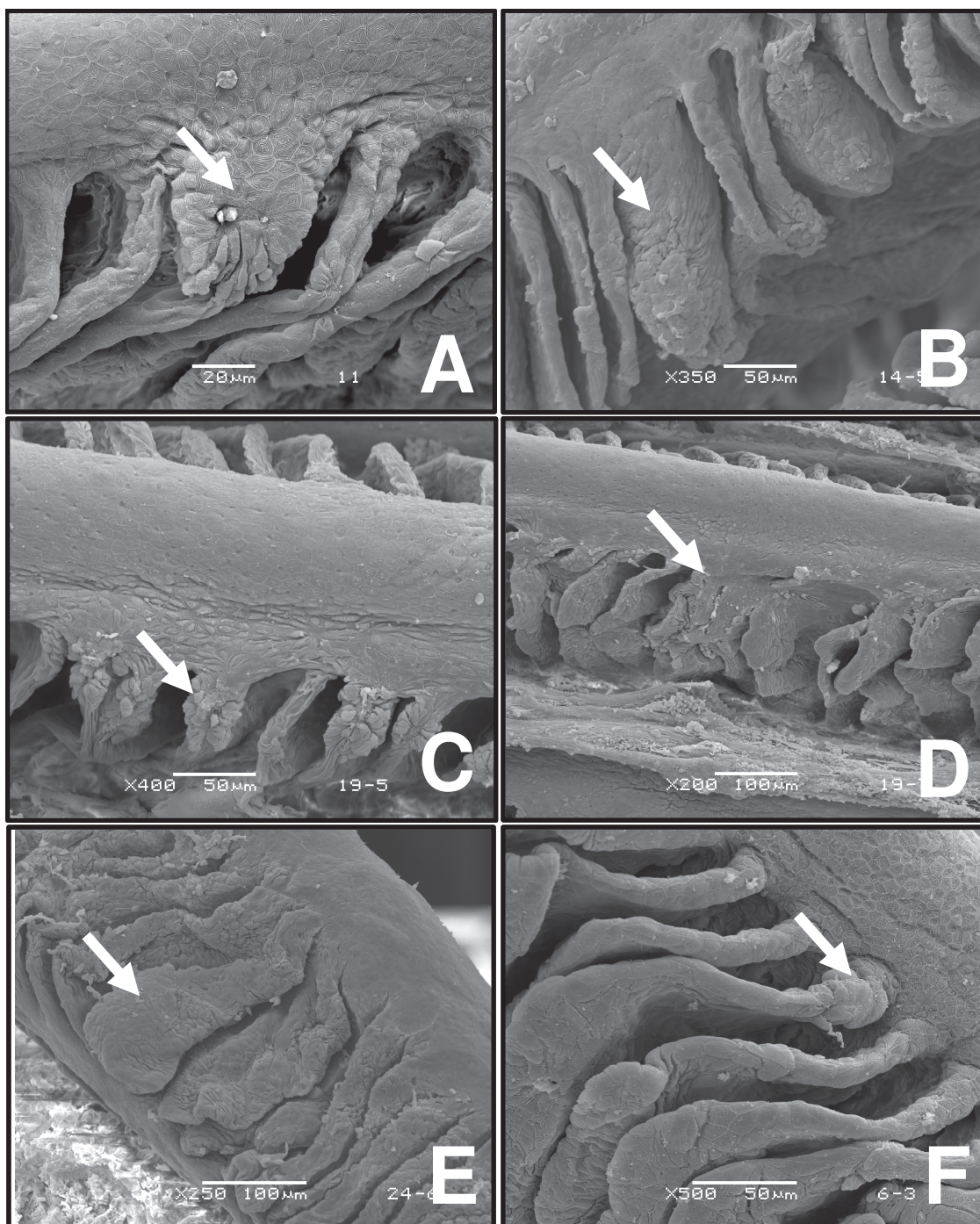
**FIGURA 13.** Organização estrutural (ML) das brânquias de *H. malabaricus*. A – Organização lamelar: lamelas primárias ( \* ), lamelas secundárias (flecha escura) . B – Formação neoplásica (seta escura). C – proliferação celular na região apical da lamela secundária (►). D – fusão lamelar (#). E e F - aneurismas ( + ). A e C - Coloração H.E. A, B, D e F – Coloração Tricrômico de Masson.





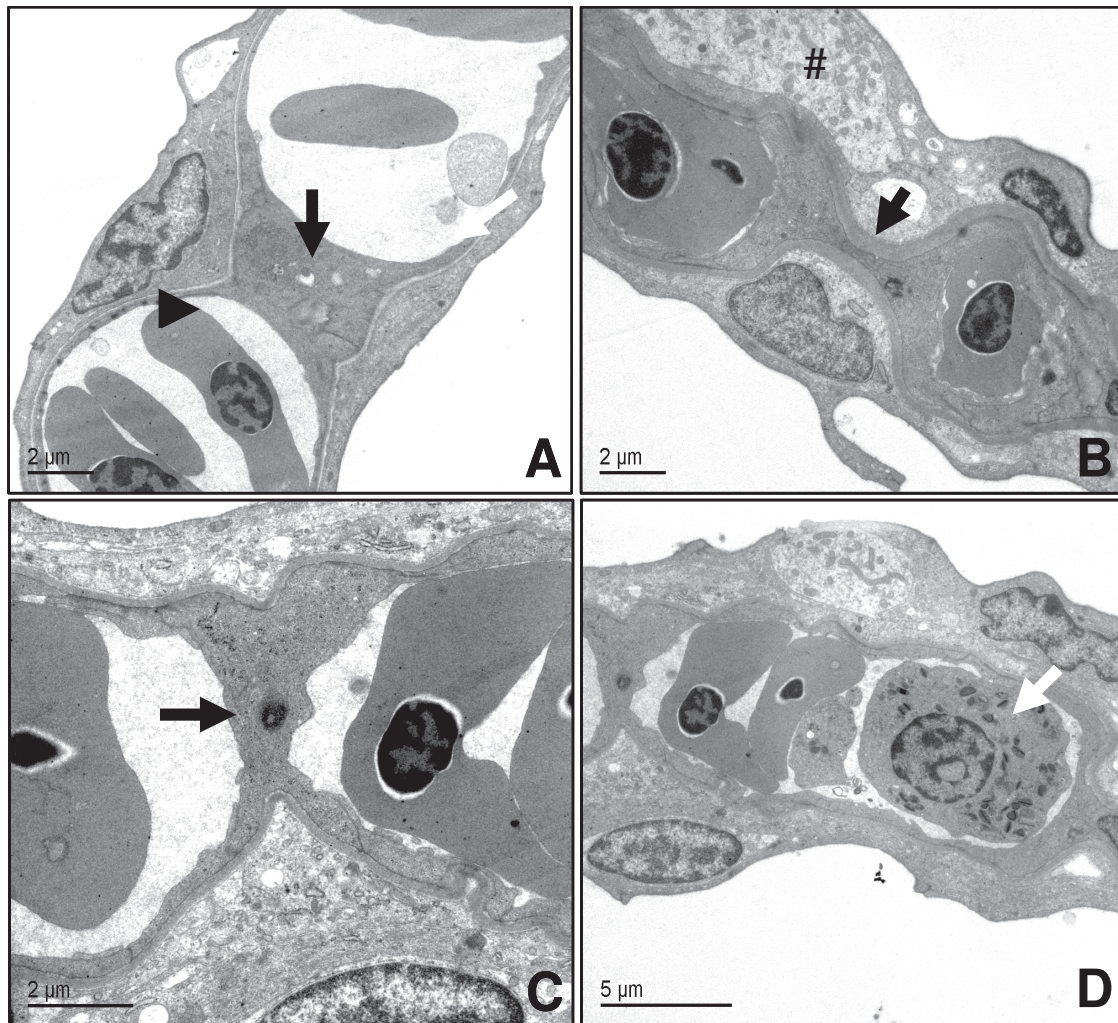
**FIGURA 14.** Organização das brânquias (MEV) de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( I ) . A e B – Brânquias sem alteração: lamelas primárias (seta escura), lamelas secundárias (seta clara). C – alteração do epitélio (seta clara). D – alteração do epitélio (seta clara). E e F – Fusão lamelar (setas claras).



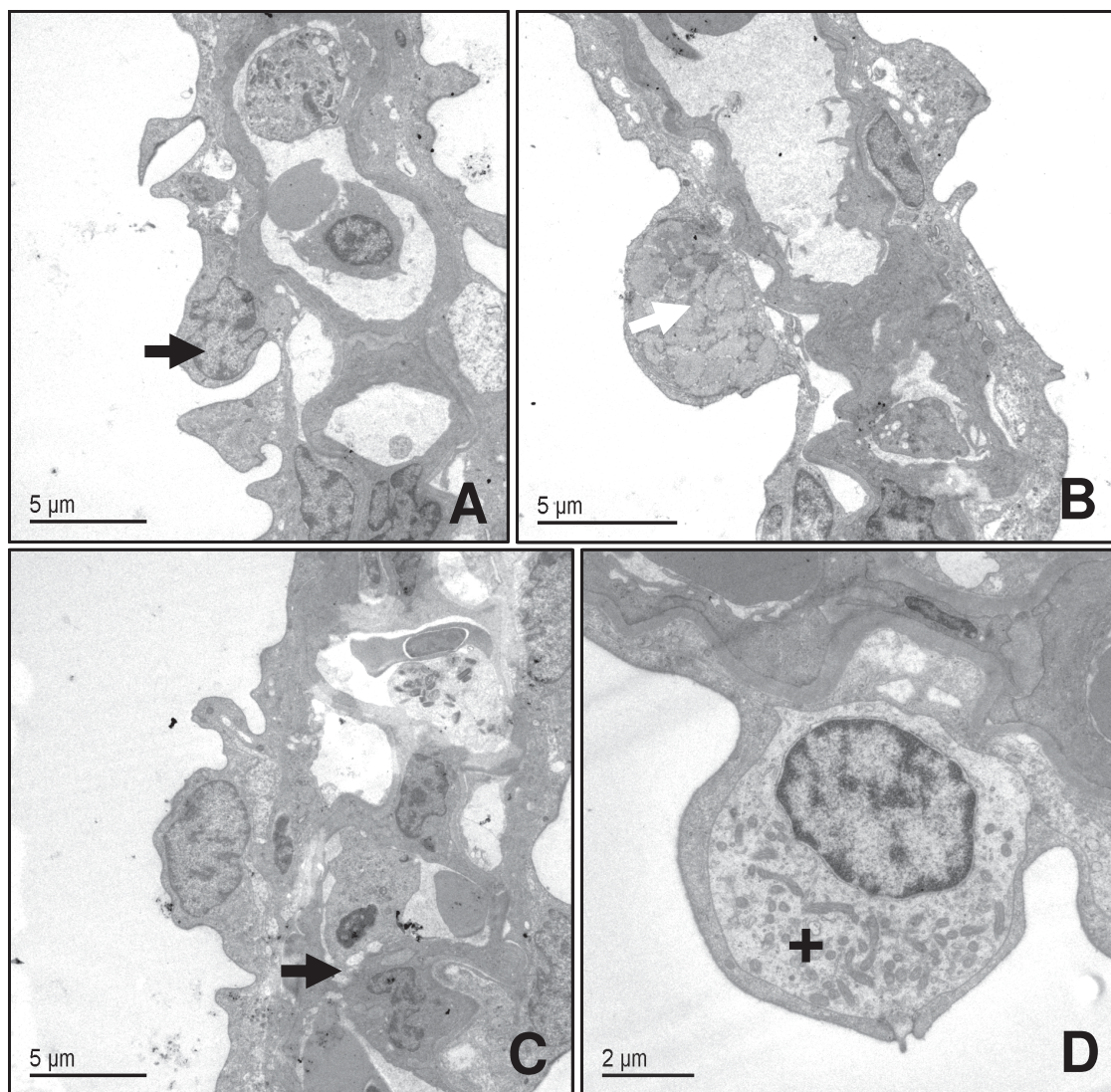


**FIGURA 15.** Organização das brânquias (MEV) de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( II ). A – neoplasia (seta clara). B – aneurisma (seta clara). D e E – fusão lamelar (seta clara). C e F – proliferação celular (setas claras).



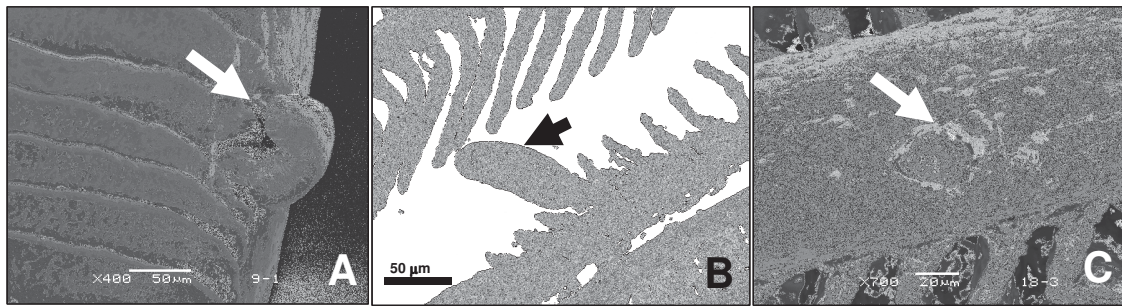


**FIGURA 16.** Organização ultraestrutural (MET) das lamelas secundárias de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( I ). A – Célula de Pilar (seta escura), célula epitelial (seta clara), vaso (►). B – Célula de Cloro (#), Constrição do vaso (seta escura). C – Alteração da célula de Pilar (seta escura). D – Leucócito (seta clara).



**FIGURA 17.** Organização ultraestrutural (MET) das lamelas secundárias de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( II ). A – alteração epitelial (seta escura). B – célula epitelial alterada (seta clara). C – vaso alterado (seta escura). D – célula de cloro ( + ).

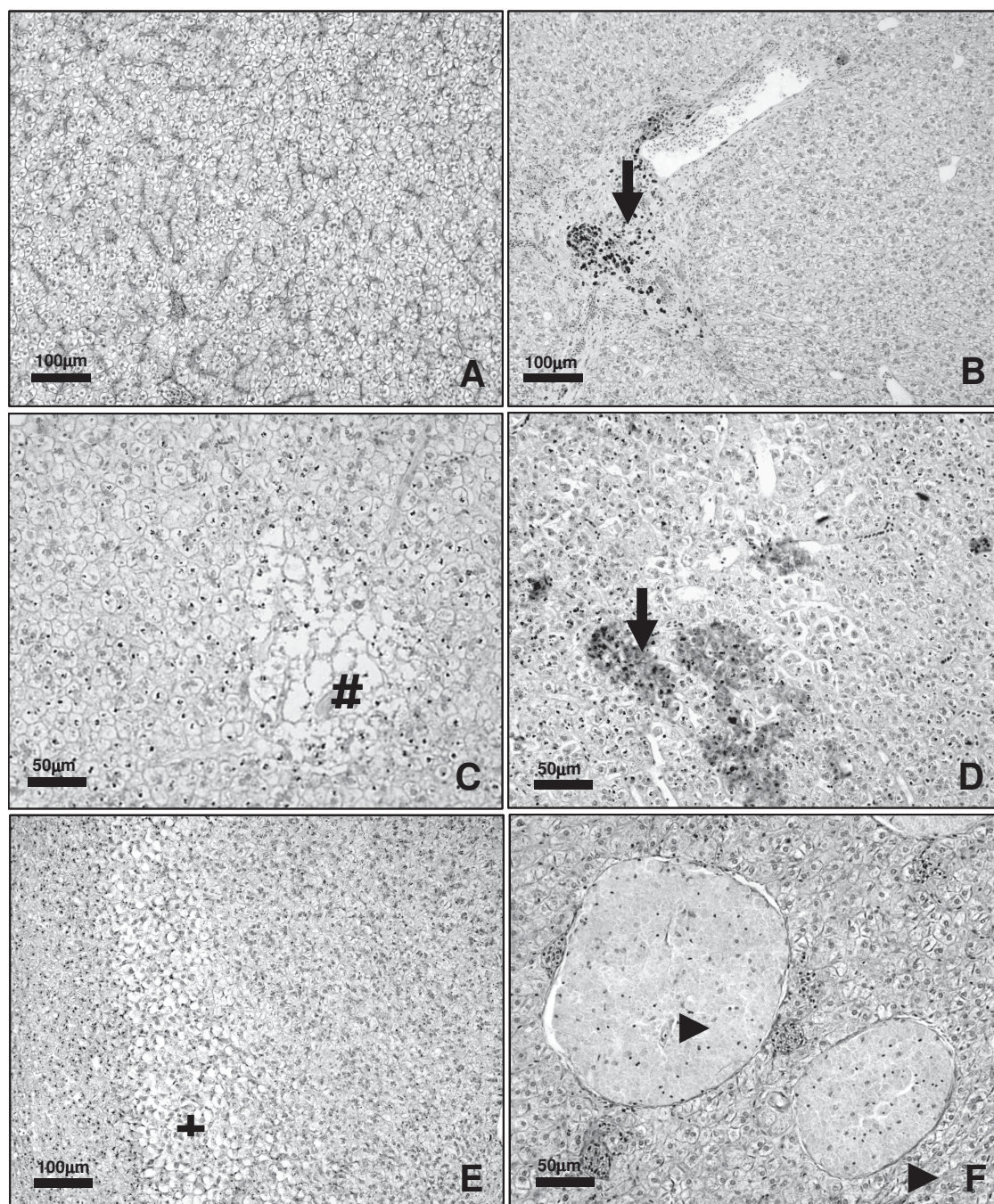




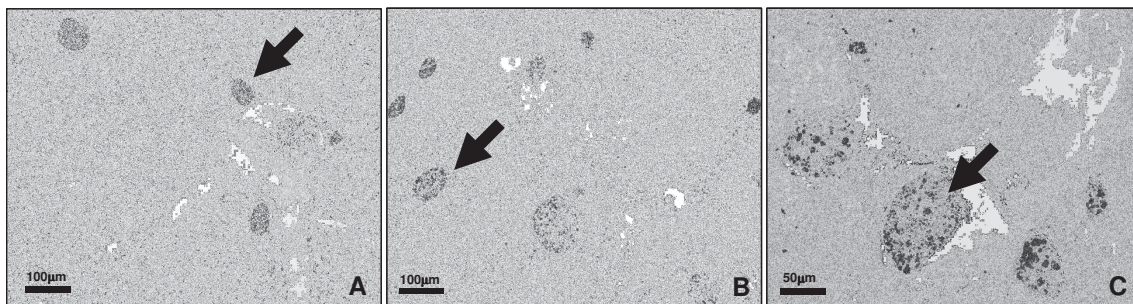
**FIGURA 18.** Brânquias de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel. A – parasita na lamela secundária (seta clara). B – parasita situado na lamela secundária (seta escura), coloração Tricrômico de Masson. C – parasita inserido na lamela secundária (seta clara).

]



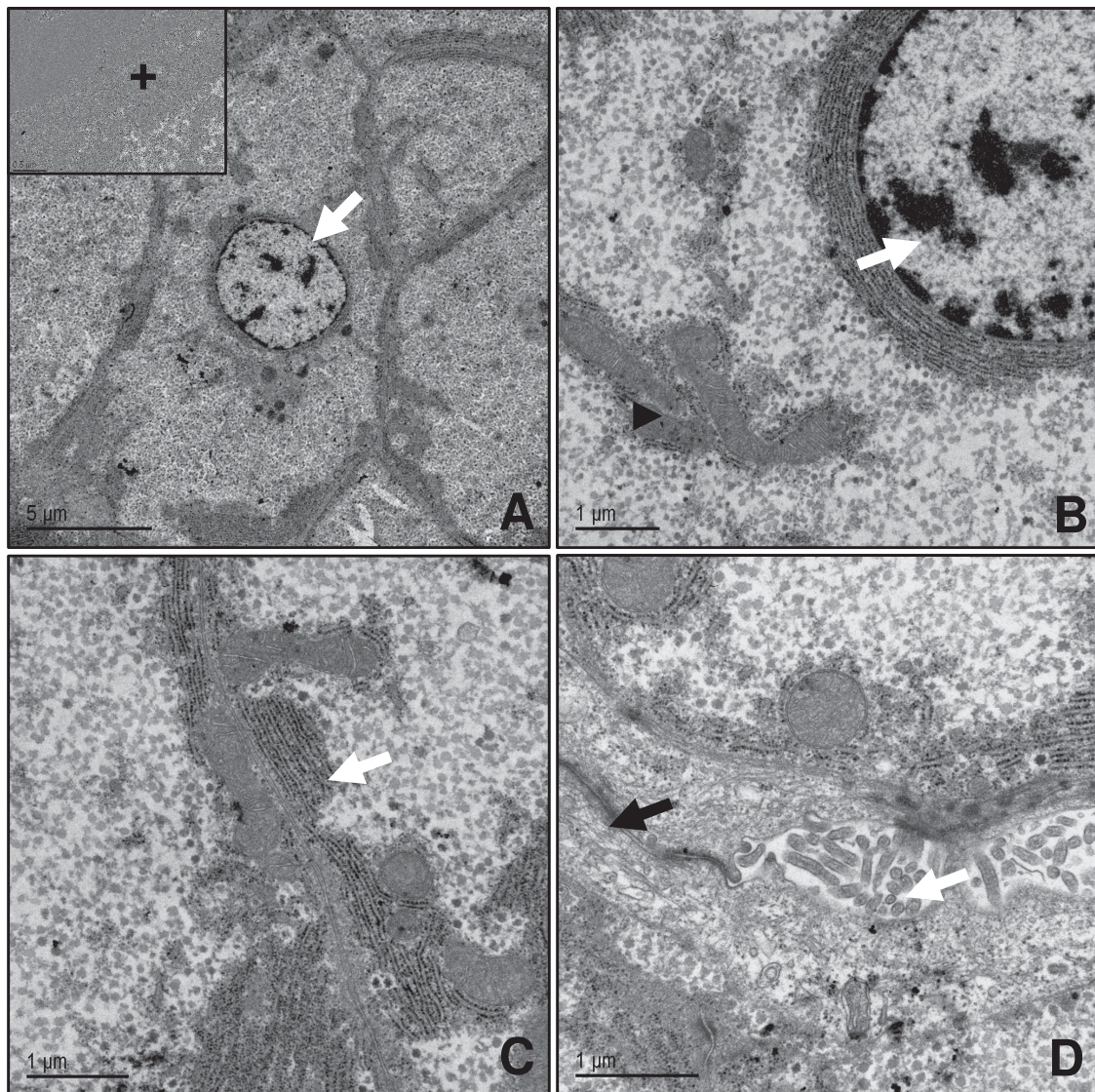


**FIGURA 19.** Organização estrutural (ML) do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( I ). A – organização do tecido hepático. B – infiltração leucocitária (seta escura). C – região de necrose (#). D – foc basófilo (seta escura). E – Região com células hepáticas diferenciadas (+). F – Formação celular atípica (►). A e C, coloração H.E. B, D, E e F, coloração Tricrômico de Masson.



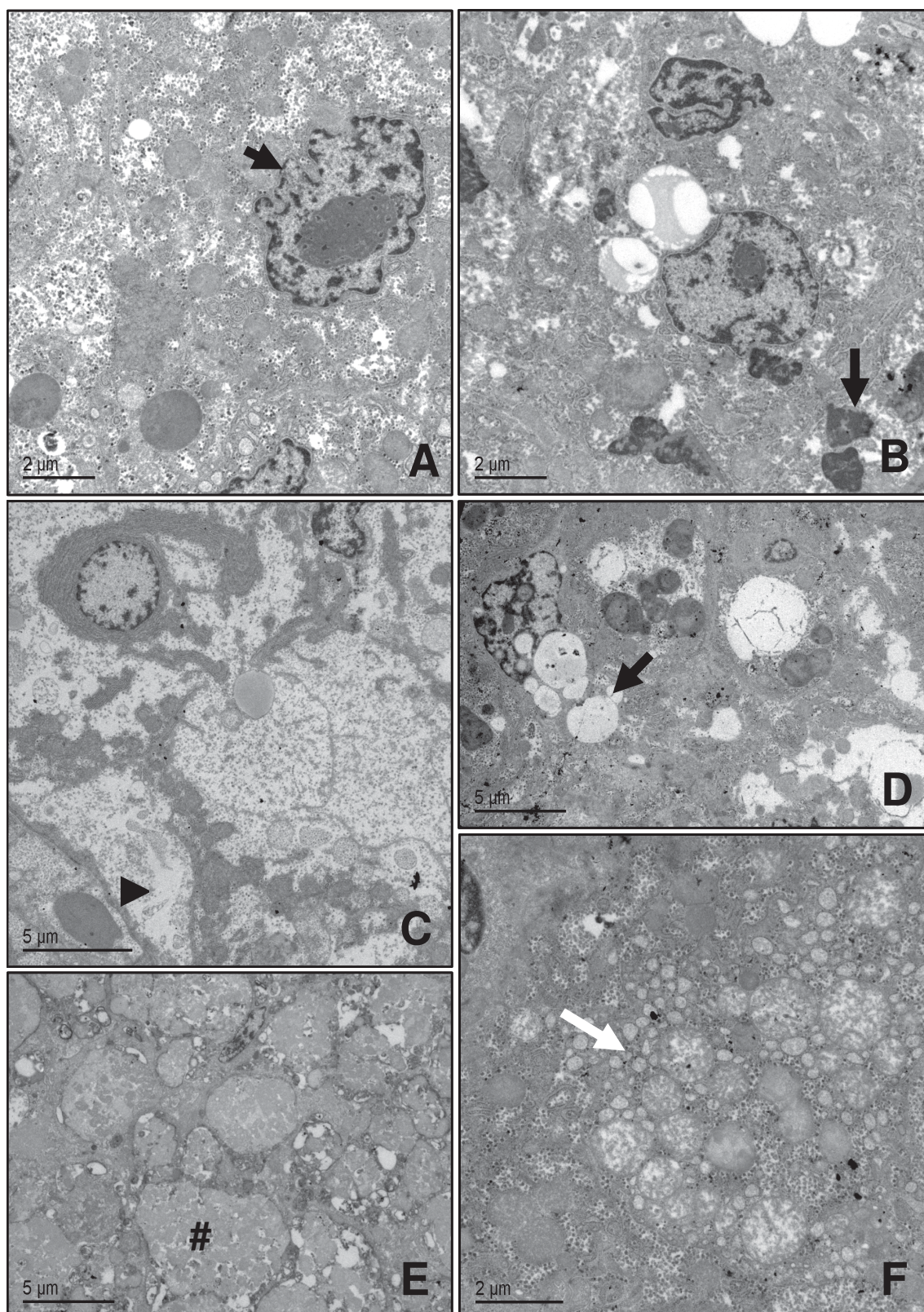
**FIGURA 20.** Organização estrutural do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-se Samuel ( II ). A, B e C – Centros de melanomacrófagos (setas escuras). A - coloração H.E. B e C - Coloração Tricrômico de Masson.





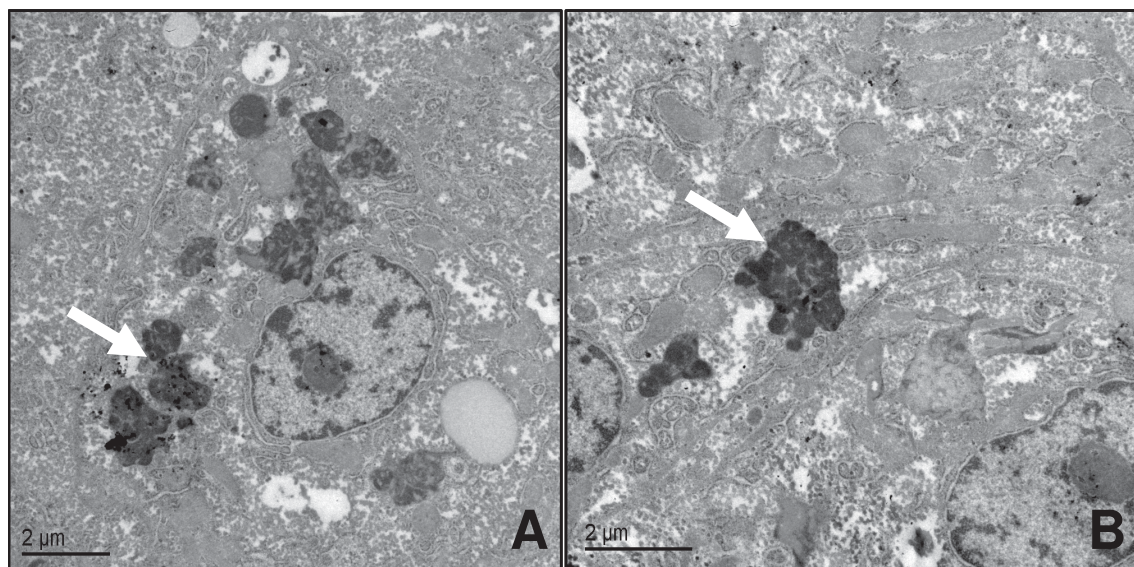
**FIGURA 21.** Organização ultraestrutural (MET) do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-se Samuel ( I ). A – Hepatócito com núcleo esférico (seta clara), retículo endoplasmático granular (+). B – núcleo (seta clara), mitocôndrias (►). C – retículo endoplasmático granular (seta clara). D – formação do canalículo biliar (seta clara), zonas de adesão (seta escura).



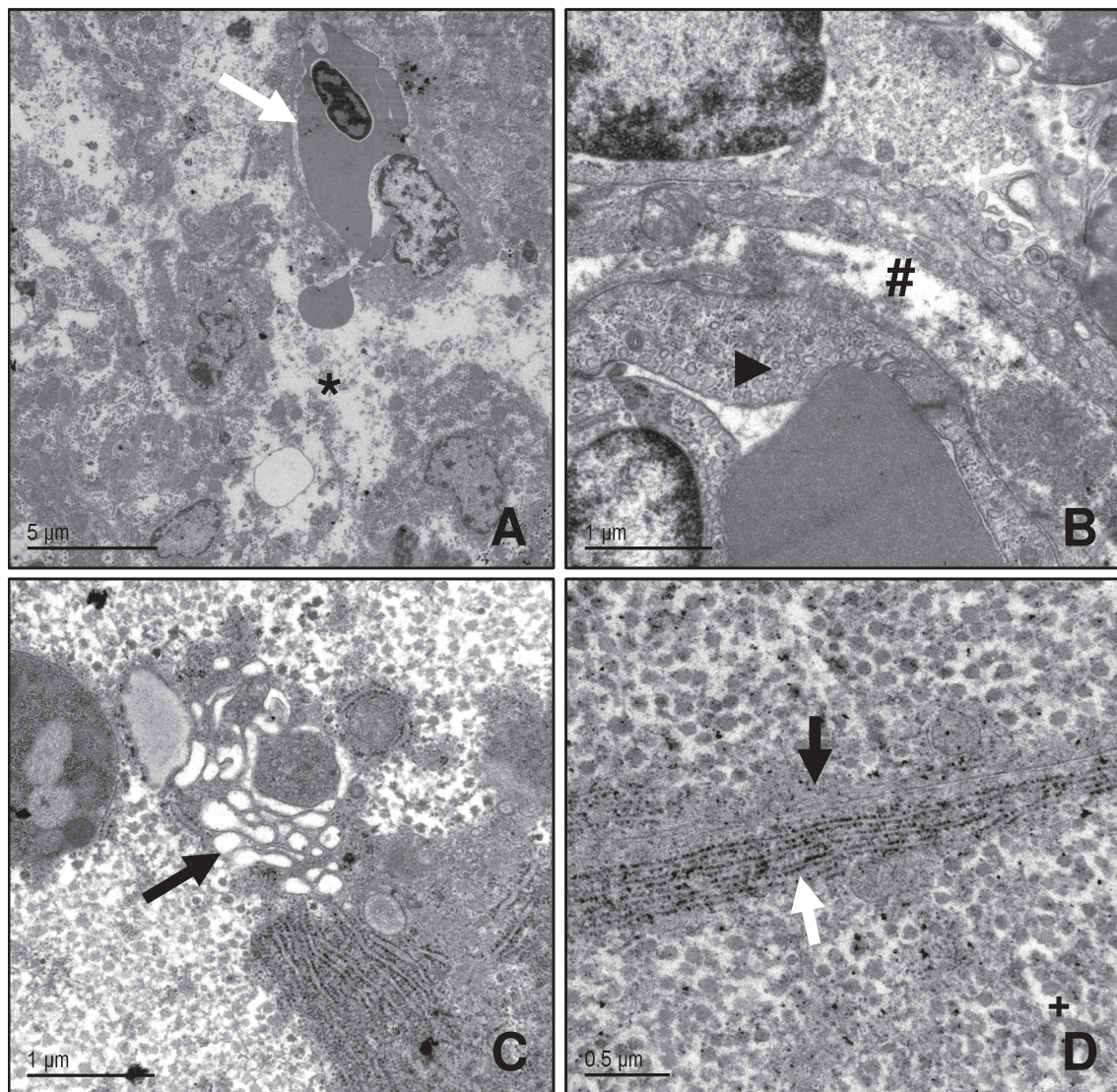


**FIGURA 22.** Organização ultraestrutural (MET) do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel (II). A – perda da morfologia nuclear (seta escura). B – estrutura eletrodensa desconhecida (seta escura). C – área de necrose (►). D – inclusões citoplasmáticas (seta escura). E – vacuolização ( # ). F – grande concentração de vesículas (seta clara).





**FIGURA 23.** Organização ultraestrutural (MET) do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( III ). A e B – grânulos eletrodensos (setas claras).



**FIGURA 24.** Organização ultraestrutural (MET) do fígado de *H. malabaricus* coletados na UHE-de Samuel ( IV ). A – região de necrose (\*), célula sanguínea no tecido (seta clara). B – célula endotelial espessa (►), espaço de Disse (#). C – dilatação do retículo endoplasmático granular (seta escura). D – célula com o retículo endoplasmático granular desorganizado (seta escura), célula com o retículo endoplasmático granular organizado (seta clara), grânulos de glicogênio (+).



## 6. DISCUSSÃO

Os estudos com a espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) nas condições de laboratório tem se mostrado muito úteis na avaliação dos danos causados por poluentes, devido a sua fácil manutenção e por ser um animal resistente e muito voraz ocupando níveis tróficos superiores da cadeia alimentar (ALVES COSTA et al., 2005, RABITTO et al., 2003, MELA, 2004). Mais recentemente, o uso de peixes como modelos de estudo e bioindicadores da qualidade do ambiente aquático tem sido freqüente tanto em condições de laboratório como em estudos de campo (MIRANDA, 2006, AHMAD et al., 2006, DURRIEU et al., 2004, AKAISHI, 2003).

Na região Amazônica os estudos de monitoramento das áreas impactadas pelo garimpo têm gerado dados mais focados nos valores quantitativos do mercúrio, ou seja, suas concentrações em amostras abióticas (sedimento, água, solo e particulado em suspensão) e bióticas (peixes, macrófitas aquáticas, cabelo das populações ribeirinhas), (BASTOS et al., 2006, DÓREA et al., 2003, LECHLER et al., 2000, MALM, 1998, PALHETA E TAYLOR, 1995, MALM et al., 1995). Mesmo para a população humana os dados são também recentes, principalmente se estão relacionados com os hábitos alimentares dessas populações (MARQUES et al., 2007, BASTOS et al., 2006, BOISCHIO E HENSHEL, 1999). Além dos estudos que quantificam as concentrações de Hg existentes nos compartimentos bióticos e abióticos, é necessário investigar quais os danos para o organismo e interpretar tais achados com os possíveis danos para o ecossistema, no entanto esta abordagem é ainda incipiente na região Amazônica.

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho em condições de campo, com a espécie *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) vem complementar os dados obtidos no trabalho desenvolvido por Mela, (2004) com a mesma espécie em condições laboratoriais, onde os resultados da concentração de Hg em músculo e fígado demonstraram que há uma tendência de aumento na concentração de mercúrio em ambos os tecidos. A correlação positiva entre níveis de Hg e massa de *Hoplias malabaricus* está de acordo

com os dados descritos por Malm e colaboradores (1995), que demonstram um aumento na concentração de Hg com o aumento do peso de outras espécies carnívoras, confirmando a biomagnificação do metal em níveis tróficos superiores. As traíras coletadas para este trabalho apresentaram uma média de  $0,319 \pm 0,037 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg com um intervalo de  $(0,063 \pm 0,005 - 1,002 \pm 0,104 \mu\text{g g}^{-1})$ . Esses valores estão próximos aos valores encontrados por Malm e colaboradores (1995) em peixes do Reservatório de Samuel no Rio Jamarí onde a média das concentrações de Hg foi de  $0,33 \mu\text{g g}^{-1}$ . Já no Rio Madeira que se encontra mais impactado pela atividade garimpeira a média encontrada foi de  $0,9 \mu\text{g g}^{-1}$ . Os exemplares de peixes provenientes do reservatório de Samuel mostraram valores 2-3 vezes menores do que os valores no Rio Madeira.

Em outro estudo também realizado na região Amazônica, foram detectados altos níveis de Hg em espécies carnívoras quando comparados com as espécies herbívoras, onde a proporção de mercúrio orgânico variou de 87-100%. Neste estudo os 13 espécimes de *Hoplias malabaricus* analisados apresentaram uma média de mercúrio total de  $0,61 \mu\text{g g}^{-1}$  (PALHETA E TAYLOR, 1994). Nos trabalhos realizados por Boischio e Henshel (1999) sobre os peixes mais consumidos pelas populações ribeirinhas Amazônicas, a Traíra ficou no grupo dos peixes mais procurados ocupando o segundo lugar entre os mais consumidos. Este grupo apresentou uma média  $0,59 \mu\text{g g}^{-1}$  de Hg no ano de 1991 e de  $0,35 \mu\text{g g}^{-1}$  em 1993 no músculo.

Comumente os peixes acumulam Hg nos diversos tecidos do corpo. Estudos realizados com a espécie *Oryzias latipes* em condições de laboratório por Oliveira Ribeiro e colaboradores (2000) e Liao e colaboradores (2006) mostraram claramente esta distribuição. De acordo com Liao e colaboradores (2006), o fígado apresentou os maiores níveis de MeHg após 8 e 16 dias de exposição. A razão pela qual o fígado apresenta as maiores concentrações de MeHg deve-se ao papel deste importante órgão de detoxificação, por onde passam os contaminantes absorvidos pelo organismo, possibilitando assim níveis mais altos de bioacumulação neste tecido. No entanto, no músculo os valores de MeHg encontrados no mencionado trabalho foram relativamente



mais baixos que no fígado. O comportamento do Hg no fígado e músculo descrito nesses trabalhos não foi o mesmo do apresentado nas traíras coletadas na UHE-de Samuel onde as concentrações de Hg no músculo ( $0,319 \pm 0,037 \mu\text{g g}^{-1}$ ) foram maiores que os valores encontrados no fígado ( $0,293 \pm 0,011 \mu\text{g g}^{-1}$ ).

A bioacumulação de mercúrio depende de vários fatores como estratégias de alimentação, tamanho e idade do indivíduo, bem como dos parâmetros físico-químicos da água que influenciam a especiação do Hg aumentando ou diminuindo sua biodisponibilidade. Isso foi demonstrado por Dórea e colaboradores (2004) nos estudos com *Serrasalmus* sp. (piranha), apesar do local estudado (Rio Negro) não possuir nenhum histórico de atividade garimpeira. Uma grande variação entre as concentrações de Hg nas duas espécies de piranhas *S. rhombeus* (piranha preta) e *S. engemmanni* (piranha branca) encontrada foi relacionada com o peso, mas não com o tamanho dos indivíduos.

Uma correlação positiva entre o peso do peixe e a concentração de Hg log-transformado no músculo também foi encontrada por Durrieu e colaboradores (2005) nos seus estudos com *Hoplias aimara* na Guiana Francesa. Estes estudos mostraram a predominância da forma metilada do Hg no músculo esquelético (94%) e a posição da espécie no topo da cadeia alimentar. Diferentemente do descrito por outros autores, o estudo também revelou que ocorre um acúmulo maior de Hg nos espécimes que pesam menos que 1 kg, ou seja, espécies menores e indivíduos mais jovens.

Na comparação entre as concentrações de Hg no músculo e o comprimento dos peixes coletados na UHE de Samuel não houve correlação positiva corroborando com os dados encontrados na literatura. Em um estudo realizado por Scerbo e colaboradores (2004) essa correlação também não foi observada para as espécies *Leuciscus cephalus cabeda* e *Chondrostoma toxostoma* coletados na boca do rio Ponteginori, na Bacia do Rio Cecina na Itália.

Altos níveis de mercúrio foram encontrados no reservatório da Hidroelétrica de Tucuruí e no Rio Mojú no Pará, onde 32 e 100% dos peixes

predatórios coletados respectivamente apresentaram valores maiores que 0,5 µg Hg/kg. Os maiores níveis de Hg encontrados nos peixes predatórios, níveis intermediários nos plânctívoros e níveis mais baixos nos herbívoros, indicam a biomagnificação do Hg ao longo da cadeia alimentar (PORVARI, 1995). Outro fator importante que pode influenciar as concentrações de Hg nos peixes é a idade do reservatório. Nos reservatórios mais novos, o processo de metilação ocorre mais rapidamente, levando a maior concentração de Hg nos peixes (BODALY E HECKY, 1979). É esperado que o processo de decréscimo do Hg ocorra nos reservatórios de 20 anos ou mais (VERTA et al., 1986). A UHE de Samuel situada no Rio Jamarí onde foram realizadas as coletas dos espécimes de *Hoplias malabaricus* para o desenvolvimento do presente estudo, é uma área que sofre a influência dos resquícios da atividade garimpeira que foi intensa no Rio Madeira, pois o Rio Jamarí é um de seus afluentes.

Praticamente não existem estudos avaliando o efeito da exposição crônica do Hg em espécies de peixes da Amazônia, e estes dados tornam-se ainda mais escassos no que se refere ao uso de biomarcadores nesta avaliação.

Sabe-se que as espécies reativas de oxigênio (ROS) são mediadores de sinalização intracelular e estão relacionadas diretamente com vários danos provocados na célula por poluentes. A excessiva produção de ROS, de qualquer modo tem um papel importante no estresse oxidativo, podendo levar a perda das funções celulares com conseqüente morte da célula. Um balanço entre os sistemas oxidantes e antioxidantes celulares, é vital para o funcionamento da célula, regulação e adaptação das diversas condições fisiológicas (NORDBERG E ARNER, 2001).

Os metais influenciam a peroxidação lipídica e o nível de peroxidação em organismos aquáticos. Os resultados encontrados em um trabalho em laboratório com o mexilhão *Bathymodiolus ozoriucus* demonstraram que o Cd e o Cu têm um efeito inibitório no sistema de defesa nas brânquias, diferentemente do que acontece com o Hg. Nas brânquias dos mexilhões expostos ao Hg houve uma indução significativa da catalase, mas as outras enzimas antioxidantes não apresentaram mudanças. A toxicidade do Hg é

relatada como causa da depleção da Glutathione, resultando na produção de espécies reativas de oxigênio e como consequência induzindo a peroxidação lipídica que pode ocasionar danos na estrutura do DNA (COMPANY et al., 2004).

No presente trabalho não houve diferença significativa entre a atividade dos biomarcadores bioquímicos (GSTs, Catalase e Peroxidação Lipídica) dos fígados de *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) coletados na UHE de Samuel-RO e os coletados no Parque do Costa-PR. Quando realizada a comparação entre as concentrações de mercúrio no fígado de *H. malabaricus* e a atividade enzimática dos biomarcadores, também nenhuma diferença estatística foi encontrada. A ausência de correlação pode estar associada com a diferença das condições climáticas as quais os grupos estiveram submetidos; na região Amazônica (clima quente e úmido) e região sul do país (clima temperado), embora pertençam à mesma espécie.

Estudos demonstram que a atividade enzimática difere também com a sazonalidade. Essas diferenças podem refletir o resultado da combinação de variáveis que incluem diferentes temperaturas e estado nutricional, como descrito por (NAPIERSKA et al., 2007). As atividades enzimáticas também podem estar relacionadas à diferença fisiológicas entre os peixes, como estágio de desenvolvimento gonadal e níveis hormonais, uma vez que a GST é uma importante enzima envolvida na degradação dos hormônios esteróides (BALDWIN E LEBLANC, 1994).

As informações sobre o desenvolvimento sexual e sazonal e as mudanças encontradas em alguns biomarcadores bioquímicos em peixes são bastante limitadas (STRANDBERG et al., 1998). Em laboratório um estudo com a espécie *Oreochromis mossambicus* (Tilápia) com duração progressiva do tempo de exposição ao Cd, demonstrou que a atividade das enzimas antioxidantes do fígado tende a aumentar com o passar do tempo, mas após 30 dias de exposição ocorre um decréscimo na atividade. Há várias hipóteses que indicam que o Cd gera tolerância. No entanto segundo Basha e Rani (2003) a elevação de GST e Catalase no fígado mostra uma possível mudança

nos mecanismos de detoxificação devido ao aumento de tempo de exposição ao Cd.

Peixes expostos a poluentes de indústria de papel que incluem metais pesados, fenóis, furanos, policíclicos aromáticos apresentaram indução e/ou supressão órgão específica de antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos. Em geral a indução foi observada no fígado e a supressão nas brânquias e rins. As respostas ao estresse oxidativo diferem quanto à espécie de peixe, habitat e comportamento alimentar (AHMAD et al., 2000).

Para uma melhor compreensão dos dados sobre os biomarcadores bioquímicos relacionados ao estresse oxidativo em peixes de regiões impactadas pelo garimpo na Amazônia, serão necessários estudos com espécies de peixes ocupando diferentes níveis tróficos, idade, sexo e de mesmo período do ano. O nosso trabalho utilizando os biomarcadores bioquímicos na UHE de Samuel no rio Jamarí foi pioneiro nessa localidade, mas faz-se necessário avaliar outros parâmetros naturais.

Os estudos de neurotoxicidade com a atividade da enzima colinesterase tem sido amplamente utilizado em biomonitoramentos principalmente se os agentes tóxicos são organofosforados, carbamatos e alguns tipos de metais (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005). Existem poucos estudos sobre a atividade desta enzima em espécies de peixes de água doce no Brasil, principalmente se estas estão relacionadas com o efeito de contaminantes. Recentemente, estudos demonstraram que a espécie *Astyanax bimaculatus* não apresentou efeitos significativos quanto à ação colinesterásica após exposição ao TBT. Este foi um dos primeiros trabalhos com espécies nativas brasileiras utilizando esta enzima na avaliação da exposição a metais (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2002).

No estudo realizado com *Hoplias malabaricus* (Block, 1794) por Rabitto e colaboradores (2005), sobre os efeitos do chumbo inorgânico e do TBT na atividade colinesterásica no cérebro e músculo axial, observou-se um aumento da atividade colinesterásica no cérebro e uma inibição da atividade no músculo sob a ação do chumbo, indicando um maior efeito neurotóxico do  $Pb^{++}$  em *Hoplias malabaricus* do que o TBT. Os indivíduos contaminados com TBT não

mostraram diferenças significativas, tanto para a colinesterase medida no cérebro como no músculo axial.

Uma série de efeitos tóxicos específicos associados com a bioacumulação de Hg como mudanças histológicas e influência da atividade da colinesterase foram descrito para *Oxyzias latipes* depois da exposição subletal a diversas concentrações do metal nas formas inorgânica e orgânica. Após 8 dias de exposição à atividade da ChE diminuiu em cada tecido estudado (cérebro, músculo, brânquias e fígado) quando comparados com o grupo controle (LIAO et al., 2006).

Devido à falta de espécimes controle na região e por ser o primeiro estudo *in locu* na UHE de Samuel que utiliza marcadores bioquímicos, para fins comparativos foi necessária a utilização de traíras de outra região. Não houve diferença significativa na comparação entre a atividade da colinesterase no músculo dos espécimes de *Hoplias malabaricus* coletados na UHE de Samuel em Porto Velho-RO e do Parque Costa - PR. Também não houve diferença significativa entre as concentrações de Hg no músculo e a atividade da ChE.

Nos estudos em bioensaios com traíras realizados por Mela e colaboradores (2007), os resultados obtidos na determinação da atividade enzimática demonstraram que o metilmercúrio afetou a atividade colinesterásica durante a exposição trófico-subcrônica, diminuindo a atividade catalítica desta enzima na traíra. Liao e colaboradores (2006) em seus estudos sugerem que os mecanismos de inibição da colinesterase por metais sejam bastante complexos ao mesmo tempo em que não são regulares. De acordo com o mesmo autor, a exposição a altos níveis de metais pesados leva a um decréscimo na atividade da colinesterase. Foi observada ainda uma inibição irregular na atividade da colinesterase tanto para as amostras controle como para as contaminadas, sendo esse fenômeno observado em diversos tecidos estudados.

Alves Costa e colaboradores (2007) demonstraram que  $H_3C-Hg^+$  pode inibir a atividade da colinesterase muscular em *H. malabaricus* depois da exposição a baixas doses, como já demonstrada nos estudos prévios com organofosforados e carbamatos. De acordo com os resultados obtidos, e

devido à posição trófica e a distribuição geográfica na América do Sul, esses pesquisadores sugerem o uso da espécie *Hoplias malabaricus* nos programas de biomonitoramento de áreas impactadas por chumbo e mercúrio.

Flammarion e colaboradores (2002) em seus estudos com Cyprinide *Leuciscus cephalus* em diferentes regiões da França contaminada por carbamatos, organofosforados e metais pesados observaram uma relação estatística entre o comprimento dos peixes e a atividade da ChE, sendo que quanto maior o peixe menor a atividade da ChE. Já na comparação entre o sexo e a atividade da colinesterase não houve relação. Nos seus estudos, dos 20 pontos amostrados apenas dois tiveram uma diminuição da atividade da colinesterase quando comparados com o controle, sendo que um dos pontos tem histórico de contaminação por Cr, Pb e Hg, mas a concentração desses no músculo dos peixes foi muito baixa.

Não houve alteração na atividade da colinesterase no trabalho realizado por Grippo e Heath (2003) com *Pimephales promelas*, onde foram utilizadas diferentes concentrações de Hg para avaliar as alterações nos hábitos alimentares de peixes.

As análises químicas em organismos alvo, e exposto cronicamente, em áreas afetadas por poluentes ajudam a validar e entender os efeitos e os danos causados pela presença de poluentes (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; MIRANDA, 2006). Os danos histopatológicos são largamente utilizados e consolidados como biomarcadores para o monitoramento de poluição aquática, também a incidência e a ausência de centros de melano-macrófagos é descrita como resultado da supressão do sistema imunológico sendo usado como biomarcador da poluição ambiental nos estudos com Chumbo, TBT e mercúrio (MIRANDA, 2006; RABITTO et al., 2005; MELA et al., 2007).

Estruturalmente os melano-macrófagos (MM) em ambas as espécies de teleósteos aparecem como células livres ou grupos de células que formam os centros de melano-macrófagos (CMMs). Essa estrutura característica do MM aparece nos rins, fígado e baço de várias espécies de peixes. Os MM livres aparecem aleatoriamente distribuídos enquanto os CMMs possuem um contorno arredondado, oval ou irregular, e frequentemente aparecem

associados à região vascularizada dos órgãos. Eles podem ser formados por poucas células, ou vários grupos de células às vezes parcialmente encapsulados. Essa cápsula consiste em uma única camada, contendo células alongadas com um núcleo central. Tanto os MM livres como os CMMs tem um material pigmentado granular e heterogêneo tendendo para o amarelo e marrom escuro (ESTEBAN et al., 1994).

Quanto à histoquímica melanomacrófagos contem ferro abundantemente sendo marcados fortemente com PAS e Masson-Fontana, método também utilizado para detectar melanina (ESTEBAN et al., 1994). Rabitto e colaboradores (2005) nos seus estudos de exposição trófica e subcrônica ao TBT e Pb <sup>++</sup> em *Hoplias malabaricus* descreveu os melano-macrófagos como contendo três tipos principais de pigmentos: lipofucina, hemociderina e melanina. Observou-se que os MMs são encontrados tanto no rim como no fígado, entretanto, raramente foram observados nos indivíduos controles. No fígado e no rim quando corados com H.E. variam de coloração marrom claro a escuro, coloração que corrobora com os resultados observados nos fígados das traíras utilizadas nesse estudo. Existem poucos dados ultraestruturais disponíveis para esta estrutura, e aspectos relacionados com sua origem, importância e significado biológico ainda é assunto em debate (ESTEBAN et al., 1994; RABITTO et al., 2005).

Tem sido sugerido que peixes (teleósteos) em privação de alimento apresentam um aumento de melano-macrófago nos rins como em truta (ANGIUS E ROBERTS, 1981), mas os mecanismos que induzem essas mudanças não são bem compreendidos nem sua relação com a deposição de MMs (MIZUMO et al., 2002).

Em um estudo com melano-macrófagos de baço e fígado de *Xiphophorus maculatus* foram verificados que estas estruturas acumulam ferro e podem reciclar compostos ferrosos. O tecido sinusóide do baço e rim pode absorver ferritina externa, podendo também limpar os resíduos em circulação, outras partículas e moléculas externas (LEKNES, 2001).

No presente estudo realizado com espécimes de *Hoplias malabaricus* provenientes da UHE de Samuel; todas as amostras de fígado analisadas



apresentaram grande quantidade de melano-macrófagos livres e centros de melano-macrófagos sendo os últimos em maior número.

Numa avaliação comparativa entre os estudos com traíras da UHE de Samuel-RO, uma região que sofre a influência do Hg lançado no ambiente pelo garimpo, e de Ponta Grossa-PR, região com atividade agrícola, urbana e industrial foi observado que os peixes de Ponta Grossa não apresentaram MMs e CMMs, diferentemente das traíras de UHE de Samuel que apresentaram grande incidência destas estruturas. Os resultados sugeriram que há uma supressão do sistema imune das traíras expostas a organoclorados e uma estimulação do sistema imune dos indivíduos expostos ao mercúrio (MIRANDA, 2006).

A presença de poluentes na água pode ocasionar mudanças patológicas em peixes. Um indicador de exposição à contaminantes é a morfologia tecidual e celular, a qual hoje constitui uma importante ferramenta na avaliação do grau de impacto sobre os organismos aquáticos, particularmente nos efeitos subletais e crônicos (BERNET et al., 1999).

A brânquia do peixe é um órgão multifuncional responsável pela respiração, osmoregulação, balanço ácido-básico e excreção de nitrogênio. Este órgão é sensível às mudanças químicas da água, uma vez que os filamentos e as lamelas branquiais proporcionam uma grande e contínua superfície de contato com a água (AU, 2004).

Nas avaliações utilizando a microscopia eletrônica de transmissão em brânquias de *H. malabaricus* provenientes da UHE de Samuel, foi verificada a presença de regiões com células epiteliais alteradas nas lamelas secundárias, danos nas células Pilares e ocorrência atípica de células de Cloro nas lamelas secundárias. Através da microscopia de luz e microscopia eletrônica de varredura extensas áreas com proliferação celular, junções lamelares e aneurismas foram observadas.

Avaliações fisiológicas têm sugerido que o Hg afeta a regulação iônica dos organismos aquáticos. Devido aos danos relatados no presente trabalho, isto implica dizer que o Hg poderia estar causando mudanças morfológicas nas brânquias em concentrações crônicas, com repercussão nos distúrbios



fisiológicos relacionados com a osmoregulação, como descrito por Newman e colaboradores (1996) após exposição aguda.

Estudos com microscopia eletrônica em brânquias de *Gambusia holbrooki* expostas a Hg demonstraram que o metal causa progressiva perda das lamelas secundárias, no entanto efeitos mais severos foram observados em maiores concentrações de Hg, mostrando uma relação direta entre a exposição ao metal e o dano no tecido. Em microscopia de luz, utilizando técnicas morfométricas, o volume das células de Cloro foi significativamente maior em todos os tratamentos com Hg quando comparados com o grupo controle. Além disso, a espessura das lamelas primárias aumentou e algumas lamelas secundárias apareceram unidas especialmente na base (JAGOE et al., 1996).

Experimentos com bioensaios de Hg com *Trichonycterus zonatus* e *Salvelinus alpinus* demonstraram que após 4 horas de exposição ao Hg, ocorre hipertrofia das células das brânquias e alterações na camada das lamelas são os primeiros danos do mercúrio inorgânico em *T. zonatus*. Após 12 e 24 horas de exposição os efeitos ficaram ainda mais evidentes em *T. zonatus*, onde foi observado o aparecimento de um epitélio escamoso e extensiva hiperplasia epitelial, e 48 horas após foram observadas pontes interlamelares nas lamelas secundárias da mesma espécie e a posterior fusão das mesmas (OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2000). Em um estudo mais detalhado com *Salvelinus alpinus* expostos ao Hg, as lamelas secundárias das brânquias revelaram severos níveis de desorganização, com vacuolização das células epiteliais e alterações nas estruturas dos eritrócitos também foram observadas. As alterações descritas para as brânquias nesse trabalho não são específicas para o Hg e podem ser observadas também para outros contaminantes.

No trabalho de Liao e colaboradores (2006) os peixes da espécie *Oryzias latipes* expostos ao cloreto de metilmercúrio apresentaram necroses no epitélio celular das brânquias, mudanças nas células Pilares e células produtoras de muco mostraram-se diferenciadas. As mudanças morfológicas encontradas evidenciam o efeito da exposição ao cloreto de metilmercúrio no papel fisiológico normal das brânquias.

A literatura também tem descrito alterações branquiais similares às causadas pelo mercúrio com outros poluentes (THIYAGARAJAH et al., 1996, THOPHON et al., 2002, AKAISHI, 2003, ELAHEE E BHAGWANT, 2007,). Após 3 semanas de exposição a óleo contendo ácidos de naftaleno (NAs) e policíclicos aromáticos (PAHs) as brânquias dos peixes *Perca flavescens* e *Carassios auratus* apresentaram necrose das células epiteliais e proliferação das células da mucosa. Mudanças na morfometria das brânquias também foram observadas o que pode comprometer as trocas gasosas (NEROA et al., 2006).

O fígado de teleósteos é um órgão primário de biotransformação de xenobióticos orgânico e provavelmente também envolvido com a excreção de elementos traço (metais). Além disso, o órgão está envolvido com a digestão, armazenamento de energia e metabolismo de hormônios sexuais. O fígado dos peixes mostra-se sensível aos contaminantes ambientais, e isto se deve ao fato de que muitos destes poluentes tendem a se acumular neste órgão, fazendo com que aumente sua exposição a níveis mais altos comparativamente com outros órgãos no mesmo organismo (HEALTH, 1995).

São vários os estudos que relatam danos histológicos e citológicos causados por poluentes no fígado (BOGOVSKI et al., 1999, OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2000, RABITTO et al., 2005; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2005; MELA et al., 2007; OLIVEIRA RIBEIRO et al., 2007, AYAS et al., 2007).

Nas observações realizadas através da microscopia de luz e eletrônica em fígado de *Hoplias malabaricus* coletados na UHE de Samuel, foram encontradas diversas alterações celulares como vacuolizações e focos necróticos em todas as amostras, infiltrações leucocitárias e alta incidência de MMs e CMMs conforme descritos anteriormente. As áreas de necrose nos fígados de *H. malabaricus* contaminadas por Hg também foram observadas nos trabalhos realizados por Mela, (2004), onde a evidência de múltiplas áreas de necroses observadas no fígado expostos as doses de metilmercúrio confirmou a grande capacidade tóxica desta forma química do Hg, quando oralmente administrado.

A necrose não é um processo natural em células saudáveis, nas quais a remoção celular dos tecidos se dá por apoptose (TAKASHIMA E HIBIYA, 1995). Na necrose as células morrem devido a uma lesão aguda, tipicamente incham e arrebentam. Elas perdem seu conteúdo provocando uma resposta inflamatória potencialmente prejudicial. Em contraste, uma célula que sofre apoptose morre de forma ordenada, sem prejudicar as células vizinhas (ALBERTS et al., 2004).

Outra alteração no fígado de traíra observada nas traíras coletadas na UHE de Samuel e também observada por Mela (2004) foi à infiltração leucocitária. A invasão de leucócitos observada nos fígados das traíras contaminadas com MeHg parecem ter acompanhado a evolução das necroses, como uma resposta do organismo à presença do tecido lesado. Alterações nucleares também foram observadas como perda da esfericidade do núcleo. Mela, (2004) também observou vacuolizações e alterações nas células endoteliais que fazem a barreira entre o sangue e o tecido hepático.

Rabitto e colaboradores (2005) descreveram o parênquima hepático no fígado de indivíduos controle de *H. malabaricus* como sendo homogêneo. Os hepatócitos são arrançados em cordões, geralmente duas células compactas entre dois sinusóides contínuos. Segundo os mesmos autores, nenhuma alteração histológica do fígado foi observada nos indivíduos expostos a quatro doses de  $Pb^{++}$  nem no grupo controle. Em contraste alterações das formas nucleares e cromatina muito densa foram observadas nos indivíduos expostos a mais doses de  $Pb^{++}$ . Baixa basofilia do citoplasma e necrose nos indivíduos expostos após 8 e 14 doses de  $Pb^{++}$  foram as mudanças histopatológicas mais importantes observadas nos fígados das traíras. Distúrbios nas distribuições das organelas sugerem que o  $Pb^{++}$  afeta a organização molecular dos componentes do citoesqueleto.

Nenhuma alteração significativa no tecido do fígado de *Salvelinus alpinus* foi observada nos trabalhos realizados por Oliveira Ribeiro e colaboradores (2002), após a administração por via trófica de Hg inorgânico. Doze horas após a ingestão do alimento as reservas lipídicas do citoplasma dos hepatócitos foram grandemente reduzidas e a quantidade de cromatina no

núcleo aumentou. Essas mudanças sugerem uma alta atividade dessas células em resposta a entrada do MeHg. Várias áreas de necroses acopladas a proliferação celular do tecido conjuntivo e infiltração de fagócitos ao redor das áreas afetadas também foram observadas.

Liao e colaboradores (2006) nos seus estudos com *Oryzias latipes* expostos a 40ng Hg/mL, observou mudanças nos hepatócitos dos fígados, como: citoplasma levemente basófilo, pequenos edemas, vacúolos e núcleos picnótico. A vacuolização dos hepatócitos de fígado de peixe é uma resposta comum a várias outras substâncias químicas e foi encontrado em várias amostras de fígado das traíras coletadas na UHE de Samuel. Conforme foi demonstrado por Ayas e colaboradores (2007), outras substâncias podem causar mudanças histológicas nos hepatócitos de peixe. Três espécies foram coletadas (*Silurus granis*, *Cyprinus carpio*, *Alburnus escherichii*), em uma região contaminada por uma grande diversidade de pesticidas organoclorados (DDT, Aldrin, Dieldrin). Na avaliação histopatológica foram observadas mudanças nas infiltrações de células mononucleares, congestão e picnose nuclear. Outro metal que demonstrou causar alterações nos hepatócitos de fígado de peixe foi o Cádmio (Cd), quando *Lates caucarifer* foram expostos a diferentes concentrações de Cd e tempo de exposição. O fígado apresentou congestão de sangue nos sinusóides, inchaço hídrico dos hepatócitos, vacuolização e acúmulo de grânulos escuros (THOPHON et al., 2003).

Apesar do teste de micronúcleo ter sido utilizado como indicador de danos citogenéticos por muitos anos (HEDDLE et al., 1991), na literatura existem poucos trabalhos que mostram a relação entre a presença de micronúcleo e a exposição ao mercúrio. A maioria dos estudos descreve a indução de micronúcleos por piretróides, bifenóis, e outros metais como o chumbo inorgânico (CAMPANA et al., 1999; FERRARO, 2003; ARKHIPCHUK E GARANKO, 2005; BOLOGNESI et al., 2006). No presente trabalho a avaliação dos eritrócitos das traíras da UHE de Samuel mostraram várias alterações nucleares já descritas na literatura por Carrasco e colaboradores (1990) e apenas um micronúcleo foi encontrado em todas as amostras analisadas.

Os efeitos genotóxicos da contaminação por mercúrio dos peixes amazônicos foram avaliados usando o teste de micronúcleo (MNs) onde distintas freqüências de MNs foram observadas em três espécies de peixes coletadas em dois rios da Bacia Amazônica (Rio Madeira e Rio Solimões). Segundo PORTO et al., (2005), as freqüências de MNs foram observadas nas seguintes espécies: *Prochilodus nigricans* (detritívoro), *Mylossoma duriventris* (onívoro) e *Hoplias malabaricus* (piscívoro). A espécie piscívora apresentou as maiores freqüências de MNs chegando a 44 MNs para os cinco espécimes coletados no Rio Madeira e 2 MNs para os seis espécimes coletadas no Rio Solimões (PORTO et al., 2005).

Em um estudo para avaliar a qualidade da água do rio Caí (Rio Grande do Sul), uma área que sofre influência petroquímica, o ensaio de micronúcleo em eritrócitos de sangue periférico do peixe *Pimephales promelas* foi utilizado para avaliar os efeitos genotóxicos destes compostos. Os organismos foram expostos por períodos diferentes (7, 14 e 21 dias), a água coletada em cinco pontos amostrais. Quando realizada a comparação entre os diferentes tempos de exposição, os Indivíduos que ficaram expostos por 14 dias foram os mais afetados, apresentando maior número de micronúcleos (LEMOS et al., 2006).

Outro estudo interessante foi o desenvolvido por Cea-Rodrigues e colaboradores (2003) com três espécies de peixe do ecossistema de água doce da Europa *Salmo trutta* (truta marrom), *Anguilla anguilla* (enguia) e *Phoxinus phoxinus*, objetivando utilizar essas espécies como bioindicadores de qualidade ambiental usando o teste de micronúcleo de eritrócitos renais. No experimento de bioensaios, diferentes concentrações de ciclofosfamida, colchicina e cádmio foram utilizadas. Não houve indução significativa de MN nos eritrócitos renais da enguia em nenhum dos tratamentos. Houve significativa indução de MN nos eritrócitos da truta marrom para as três substâncias utilizadas, e indução de MN nas células de *Phoxinus phoxinus* apenas quando expostas ao cádmio. A truta marrom foi à espécie mais sensível aos compostos genotóxicos utilizados.

As informações obtidas com o desenvolvimento desse trabalho podem ser utilizadas para complementar as demais pesquisas que vem sendo

realizadas na região Amazônica. Futuros estudos *in situ* não somente com a espécie *Hoplias malabaricus*, mas com outras variedades de peixes poderão dar uma visão mais ampla dos efeitos que o mercúrio tem causado a região.

## 7. CONCLUSÕES

- Conforme demonstrado por outros estudos realizados, a espécie *Hoplias malabaricus* constitui um bom bioindicador para o estudo dos efeitos de poluentes;
- Os dados de concentração de Hg em fígado e músculo de *Hoplias malabaricus* da UHE de Samuel-RO, e a correlação encontrada entre o peso e essas concentrações corroboram com os dados encontrados por outros pesquisadores;
- Os valores de mercúrio encontrados mostram que a traíra tem a tendência de acumular Hg em tecidos como músculo e fígado por ser um animal topo de cadeia;
- Com relação aos biomarcadores bioquímicos (GSTs, Catalase, Peroxidação lipídica), quando realizada a comparação entre as concentrações de mercúrio no fígado de *H. malabaricus* e a atividade enzimática dos biomarcadores; nenhuma diferença foi encontrada;
- Os biomarcadores bioquímicos não foram sensíveis ao ponto de evidenciar alterações no equilíbrio oxido-redutor dos hepatócitos ou na atividade da colinesterase em músculo;
- A alta incidência de melano-macrófagos livres e centros de melano-macrófagos, mostram que esta estrutura pode ser utilizada como biomarcador imunológico nos estudos de toxicologia ambiental;
- As mudanças histopatológicas encontradas nas amostras de fígado (necrose, infiltração leucocitária) e brânquias (fusão lamelar, descolamento do epitélio, proliferação celular) dão evidência de que o mercúrio pode comprometer a qualidade de vida dos organismos cronicamente expostos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMS, H.R. **Drogas que atuam sobre o sistema somático e autonômico**. In: BOOTH e Mc DONALD, L.E. Farmacologia e Terapêutica em Veterinária. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. p. 57-109. 1992.
- AEBI H. Catalase *in vitro*. **Academic Press**. 105:121-126. 1984
- AHMAD, I.; MARIA, V.L.; OLIVEIRA, M.; PACHECO, M.; SANTOS M.A. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to  $\alpha$ -naphthoflavone. **Mutation Research**. 608: 16–28. 2006.
- AKAGI, H.; MALM, O.; KINJO, Y.; HARADA, M.; BRANCHES, F.J.P.; PFEIFFER, W.C.; KATO, H. Methylmercury pollution in the Amazon, Brazil. **The Science of the Total Environment**. 175: 85-95. 1995.
- AKAISHI, F.M. Aplicação de Biomarcadores de Contaminação Ambiental em Estudos de Laboratório e Monitoramento de Campo. 2003. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.
- ALBERINI, R.J.; ANDERSON, D.; DOUGLAS, G.R.; HAGMAR, L.; HERMMINKI, K.; MERLO, F.; NATARAJAN, S.T.; NORPPA, H.; SHUKER, D.E.G.; TICE, R.; WATERS, M.D.; AITIO, A. IPCS guidelines for monitoring of genotoxic effects of carcinogen in human. **Mutation Research – Reviews in Mutation Research**. Amsterdam. 463: 111-172. 2000.
- ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. Trad. Ana Beatriz Gorini da Veiga et al. 4ª Edição. Porto Alegre. Artmed, 2004.
- ALVES COSTA, J.R.M.; MELA, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, E.; RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Enzymatic inhibition and morphological changes in *Hoplias malabaricus* from dietary exposure to lead(II) or methylmercury. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2007.
- ANGIUS, C. E ROBERTS, R.J. Effects of starvation on the melano-macrophage centres of fish. **Journal of Fish Biology**. 19: 161-169. 1981.
- ARKHIPCHUK, V.V. E GARANKO, N.N. Using the nuclear biomarker and the micronucleos test on in vivo fish fin cells. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 62: 42-52. 2005.
- AU, D.W.T. The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. **Marine Pollution**. 48: 817–834. 2004.
- AZEVEDO, P.E. E GOMES, A..L.. Contribuição ao estudo da biologia da traíra *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794). **Boletim de Indústria Animal**. 5: 15-64. 1943.
- AYAS, Z.; EKMEKCI, G.; OZMENB, M.; YERLI, S.V. Histopathological changes in the livers and kidneys of fish in Sariyar Reservoir, Turkey. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 23: 242–249. 2007.
- AYLLON, G. E GARCIA-VAZQUEZ, E. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in minnow *Phoxinus phoxinus* and mollie *Poecilia latippina*: an assessment of the fish micronucleos test. **Mutation Research**. 467: 177-186. 2000.



BARBOSA, L.N. E LOBATO, A.L. Garimpo e Meio Ambiente consciência ecológica e a relação nacional-regional. Desenvolvimento e Tecnologia Ambiental. **Centro de Tecnologia Mineral**. CNPq-CETEM. São Paulo. 1990.

BAIRD, C. **Química Ambiental**. p. 404-417. Bookman 2 Ed. Porto Alegre, 2004.

BALDWIN, W.S. E LEBLANC, G.A. In vivo biotransformation of testosterone by phase I and II detoxication enzymes and their modulation by 20-hydroxyecdysone in *Daphnia magna*. **Aquatic Toxicology**. 29 (1–2), 103–117. 1994.

BASHA, P.S. E RANI, A.U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56: 218–221. 2003.

BASTOS, W. R.; MALM, O.; PFEIFER, W. C.; and CLEARY, D. Establishment and analytical quality control of laboratories for Hg determination in biological and geological samples in the Amazon Brazil. **Ciência e Cultura Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**. 50: 255-260. 1998.

BASTOS, W. R. Ocorrência ambiental do mercúrio e sua presença em populações ribeirinhas do Baixo Rio Madeira-Amazônia. 2004. **Tese** (Doutor em Ciências) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

BASTOS, W.R.; GOMES, J.P.O.; OLIVEIRA, R.C.; ALMEIDA, R.; NASCIMENTO, E.L.; BERNARDI, J.V.E.; LACERDA, L.D.; SILVEIRA, E.G.; PFEIFER, W.C. Mercury in the Environment and riverside population in the Madeira river, Amazon, Brazil. **Science of the Total Environment**. 368: 244-251. 2006.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; BURKHARDT-HOLM, P.; & WALHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**. 22: 25-34. 1999.

BOGOVSKI, S.; LANG, T.; MELLERGAARD, S. Histopathological examinations of liver nodules in flounder (*Platichthys flesus* L.) from the Baltic Sea. **Journal of Marine Science**. 56: 148–151. 1999. Short communication.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**. 78S: 93-98. 2006.

BODALY, O. E HECHY, R. Post-impoundment Increases in Fish Mercury Levels in the Southern Indian lake Reservoir, Minnetoba. **Fisheries and Marine Service manuscript Report**. 1531: 15. 1979.

BOISCHIO, A.A.P. E HENSHEL, D. Fish Consumption, Fish Lore, and Mercury Pollution Risk Communication for the Madeira River People. **Environmental Research Section**. 84A: 108-126. 2000.

BOLOGNESI, C.; PERRONE, E.; ROGGERI, P.; PAMPANIN, D.M.; SCIUTTO, A. Assesmente of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions. **Aquatic Toxicology**. 78S: 93-98. 2006.

BRADFORD, M. A rapid and a sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. 72: 248-254. 1976.

CAMPANA, M.A.; PANZERI, A.M.; MORENO, V.J. DULOUT, N.F. Genotoxic evaluation of pyrethroid lambda-cyhalothrin using the micronucleos test in erythrocytes of fish *Cheirodon interruptus interruptus*. **Mutation Research**. 438:155-161. 1999.

CARRASCO, K.R.; TILBURY, K.L.; MYERS, M.S. Assesmente of the piscine micronucleos test as an in situ Biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**. vol 47. 1990.

CARVALHO, W.F. **Técnicas médicas de hematologia e imuno-hematologia**. Editora Coopmed, Belo Horizonte, 66-175. 1994.

CEA-RODRIGUES. A.; AYLON, F.; GARCIA-VAZQUEZ, E. Micronucleos test in freshwater fish apcies: an evaluation of its sensitivity for applicaton in field surveys. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56: 442-448. 2003

COMPANY, R.; SERAFIM, A.; BEBIANNO, M.J.; COSSON, R.; SHILLITO, B.; FIALA-MEDIONE, A. Effect of cadmium, c,opper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*. **Marine Environmental Research**. 58: 377–381. 2004.

CRUZ, T.M.E. Determinação de mercúrio em urina e cabelo de dentistas e outros trabalhadores da área médica do Distrito Federal. 1995. **Dissertação** (Mestre em Química) – Instituto de Ciências Exatas da Universidade Federal de Brasília.

DIGIULIO, R.T.; HABIG, E.P. C. GALLAGHER, Ejects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catsh. **Aquatic Toxicology**. 26: 1-22. 1993.

DURRIEU, G.; BRACHET-MAURY,R.; BOUDOU, A. Goldmining and mercury contamination of the piscivorous fish *Hoplias aimara* in French Guiana (Amazon Basin).**Ecology and Environmental Safety**. 60: 315-323. 2005.

DÓREA, J.G. BARBOSA, A.C.; SOUZADE, J.; FADINI, P.; JARDIM, W.F. Piranhas (*Serrasalmus spp.*) As markers of mercury buoaccumulation in Amazonian ecosystems. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 59: 57-63. 2004.

EBINGHAUS, R. TRIPATHI, R.M.; WALLSCHLAGER, D.; LINDBERG, S.E. Natural and Anthropogenic Mercury Sources and their Impact on Air- Surface Exchange of Mercury an Regional and Global Sacales. **GKSS reseach Centre**. Alemanha. 1998.

EINSENBUD, M. **Environment Tchnology and Health Human Ecology in Historical Perspective**. Cap. 10. Pag. 247-265. New York. 1978.

ELAHEE, K.B. E BHAGWANT, S. Hematological and gill histopathological parameters of three tropical fish species from a polluted lagoon on the west coast of Mauritius **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2007.

ESTEBAN, M.A.; RUIZ-LOPEZ, A.; MESEGUER, J. Melano-macrophages of seawater teleosts, sea bass (*Dicentrarcus labrax*) and gilthead seabream (*Sparus aurata*): morphology, formation and possible function. **Cell & Tissue Research**. 277: 1-10. 1994.

FEARNSIDE, P.M. Brazil's Samuel Dam: Lessons for Hydroelectric Development Policy and the Environment in Amazonia. **Environmental Management**.Vol. 35 (1): 1–19. 2005.

FERRARO, M.V.M. Avaliação do efeito mutagênico do Tributilestanho (TBT) e do chumbo inorgânico (Pb II) em *Hoplias malabaricus* (piscies) através dos ensaios: cometa, micronúcleos e de aberrações cromossômicas. 2003. **Dissertação de Mestrado**. Pós-graduação em Genética da Universidade Federal do Paraná.

FLAMMARION, P.; NOURY, P.; GARRIC, J. The measurement of cholinesterase activities as a biomarker in chub (*Leuciscus cephalus*): the fish length should not be ignored. **Environmental Pollution**. 120: 325–330. 2002.

- FIELDLER, N.; UDASIN, I.; GOCHFELD, M. BUCKLER, G.; KELLY, M.K.; KIPEN, H. Neuropsychological and stress evaluation of residential mercury exposure. **Environmental Health Perspectives**. 107(5): 343-347. 1999.
- GIREAULT, L.; BOUDOU, A.; DUFOURC, E. J. Methyl mercury interactions with phospholipids membranes as reported by fluorescence,  $^{31}\text{P}$  and  $^{199}\text{Hg}$  NMR. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1325: 250-262. 1996.
- GOCHFELD M. Cases of mercury exposure, bioavailability, and absorption. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 56: 174-179. 2003.
- GRIPPO, M.A. E HEATH, A.G. The effect of mercury on the feeding behavior of fathead minnows (*Pimephales promelas*). **Ecotoxicology Environmental Safety**. 55: 187-198. 2003.
- HALLIWELL, B. E GUITTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 2.ed. New York : Clarendon Press. p.198. 1991.
- HALLIWELL, B. E GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press.p. 543.1989.
- HEALTH, A.G. Water Pollution and Fish Physiology, second ed. CRC Lewis Publishers, Boca Raton, FL. pp. 125–140. 830 D.W.T. Au / **Marine Pollution Bulletin**. 48: 817–834. 1995.
- HEDDLE, J.A.; CIMINO, M.C.; HAYASHI, M.; ROMAGN, F.; SHELBY, M.D. TUCKER, J.D.; VANPARYS, P.H. MACGREGOR, J.T. Micronucleos test as asn index of cytogenetic damage: present, past and future. **Environmental Molecular Mutagenese**. 18: 277-291. 1991.
- HOOFTMAN, R.N. E RAAT, W.K. Induction of nuclar anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of eastearn mudminnow umbra pygmea by ethyl methanesulphonate. **Mutation Research**. 104: 147-152. 1982.
- JAGOE, C.H.; FAIVRE, A.; NEWMAN, M. Morphological and morphometric changes in the gills of mosquitofish (*Gambusia holbrooki*) after exposure to mercury (II). **Aquatic Toxicology**. 34: 163-183. 1996.
- JAGOE, C. H.; SHAW-ALLEN, P. L.; BRUNDAGE, S. Gill  $\text{Na}^+$   $\text{K}^+$ -ATPase activity in largemouth bass (*Micropterus salmoides*) from three reservoirs with different levels of mercury contamination. **Aquatic Toxicology**. 36: 161-176. 1996.
- JIANG, Z-Y., HUNT, J. V., WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xylenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**. 202 (2): 384-389. 1992.
- KEEN , J. H. ; HABIG, W.H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the Glutathione-S- Transferase. **Journal Biological Chemistry**. 251: 6183-6188. 1976.
- LACERDA, L. D. E SALOMONS, W. **Mercúrio na Amazônia: uma bomba relógio química?** Rio de Janeiro, CETEM. 1992.
- LAM, P.K.S. E GRAY, J.S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**. 46: 182–186. 2003.
- LARS D.; HYLANDER L.D.; MEILI, M. 500 years of mercury production: global annual inventory by region until 2000 and associated emissions. **The Science of the Total Environment**. 304: 13–27. 2003.
- LECHLER, P.J.; MILLER, U.J.R.; LACERDA, L.D.; VINSON, D.; BONZONGO, J.C.; LYONS, W.B.; WARWICK, J.J. Elevated mercury concentrations in soils, sediments,

water, and fish of the Madeira River basin, Brazilian Amazon: a function of natural enrichments? **The Science of the Total Environment**. 260: 87-96. 2000.

LEKNES, I.L. The uptake of foreign by macrophages in the spleen, trunk Kidney and liver of platy. **Journal of fish Biology**. 59: 1412-1415. 2001.

LEMONS, C.T.; RODEL, P.M.; TERRA, N.R.; D'AVILA DE OLIVEIRA, N.C.; ERDTMANN, B. River water genotoxicity evaluation using micronúcleos assay in fish erythrocytes. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2007.

LIAO, C.Y.; FU, J.J.; SHI, J.B.; ZHOU, Q.F.; YUAN, C.G.; JIANG, G.B. Methylmercury accumulation, histopathology effects, and cholinesterase activity alterations in medaka (*Oryzias latipes*) following sublethal exposure to methylmercury chloride. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 22: 225-233. 2006.

LINDQVIST O.; JERNELOV, A.; JOHANSSON, K.; RODHE, H. Mercury In The Swedish Environment Global And Local Sources. National Swedish **Environment Protection Board**. Solna. 1984.

LOPES, P.A.; PINHEIRO, T.; SANTOS, M.C.; MATHIAS, M.L.; PEREIRA, M.J.C.; CRESPO, A.M.V. Response of antioxidant enzymes in freshwater fish populations *Leuciscus alburnoides* complex to inorganic pollutants exposure. **The Science of the Total Environment**. 280:153-163. 2001.

MALM, OLAF. Contaminação ambiental e humana por mercúrio na região garimpeira de ouro do rio Madeira, Amazônia. 1991. **Tese** (Doutor em Ciências) - Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro.

MALM, O. Gold Mining as a Source of Mercury Exposure in the Brazilian Amazon. **Environment Research**. 77: 73-78. 1998.

MALM, O; CASTRO, M.B.; BASTOS, W.R.; BRANCHES, F.P.; GUIMARÃES, J.R.D.; ZUFFO, C.E.; PFEIFFER W.C An assessment of Hg pollution in different goldmining areas, Amazon Brazil. **The Science of the Total Environment**. 175:127-140. 1995.

MELA, M.; RANDI, M.A.F.; VENTURA, D.F.; CARVALHO, C.E.V.; PELLETIER, E. OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, 2007

MELA, Maritana. Uso de Biomarcadores na Avaliação dos efeitos do Metilmercúrio em *Hoplias malabaricus* (BLOCK, 1794) (Traíra). 2004. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

MIRANDA, A.C. Bioacumulação de pops (poluentes organopersistentes) em *Hoplias malabaricus* e efeitos *in vitro* de misturas complexas em células do sistema imune de *Cyprinus carpio*. 2006. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

MARIA, V.L.; CORREIA, A.C.; SANTOS, M.A. *Anguilla anguilla* L. genotoxic and liver biotransformation responses to abietic acid exposure. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 58: 202-210. 2004.

MIZUMO, S.; MAISAKA, N.; MIYAKOSHI, Y.; TAKEUCHI, K.; KASAHARA, N. Effects of starvation on melano-macrophages in the Kidney of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). **Aquaculture**. 209: 247-255. 2002.

MONTEIROA, M.; QUINTANEIROA, C.; MORGADOS, F.; SOARES, A.M.V.M.; GUILHERMINOB, L. Characterization of the cholinesterases present in head tissues of

the estuarine fish *Pomatoschistus microps*: application to biomonitoring. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 62: 341-347. 2005.

NAPIERSKAA, D.; KOPECKAB, J.; PODOLSKAA, M.; PEMPKOWIAKB, J. Hepatic glutathione S-transferase activity in flounder collected from contaminated and reference sites along the Polish coast. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 2007.

NEROA, V.; FARWELLA, A.; LISTERB, A.; VAN DER KRAAK, G.; LEEC, L.E.J.; VAN MEERD, T.; MACKINNONE, M.D.; DIXONA, D.G. Gill and liver histopathological changes in yellow perch (*Perca flavescens*) and goldfish (*Carassius auratus*) exposed to oil sandsprocess-affected water. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 63:365–377. 2006.

NIERENBERG, D.W.; NORDGREN, R.E.; CHANG, M.B.; SIEGLER, R.W.; BLAYNEY, M.B.; HOCHBERG, F.; TORIBARA, T.Y.; CERNICHIARI, E.; CLARKSON, T. Delayed cerebellar disease and death after accidental exposure to dimethylmercury. **New England Journal Medicine**. 338 (23): 169-172. 1998.

NORDBERG JONAS E ARNER ELIAS S. J. Reactive Oxygen Species, Antioxidants, and the Mammalian Thioredoxin System. Free Radical. **Biology & Medicine**. 31 (11): 1287–1312. 2001.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PADRÓS, J.; VALDEZ DOMINGOS, F.X.; AKAISHI, F.M.; PELLETIER, É. Histopathological evidence of antagonistic effects of tributyltin on benzo[a]pyrene toxicity in the Arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Science of the Total Environment**. 372: 549–553. 2007.

OLIVEIRA RIBEIRO CA, VOLLAIRE Y, SANCHEZ-CHARDI A, ROCHE H. Bioaccumulation and the effects of organochlorine pesticides, PAH and heavy metals in the Eel (*Anguilla anguilla*) at the Camargue Nature Reserve, France. **Aquatic Toxicology**. 74 (1): 53-69. 2005.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; SCHATZMANN, M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; SILVA, P.H.; PELLETIER, É.; AKAISHI, F.M. Evaluation of Tributyltin Subchronic Effects in Tropical Freshwater Fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 51: 161–167. 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; BELGER, L.; PELLETIER, É.; ROULEAU, C. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic charr (*Salvelinus alpinus*). **Environmental Research**. 90: 217-225. 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C.A.; PELLETIER, E.; PFEIFFER, W.C.; ROULEAU, C. Comparative uptake, bioaccumulation, and gill damages of inorganic mercury in tropical and nordic freshwater fish. **Environmental Research Section**. 83: 286-292. 2000.

PAIVA, M.P. Fisiocologia da traíra, *Hoplias malabaricus* (Block, 1794), no Nordeste Brasileiro. São Paulo. **Tese de Doutorado**. Universidade de São Paulo. São Paulo, 1972.

PALACE VP, DICK TA, BROWN SB, BARON CL, KLAVERKAMP JF. Oxidative stress in Lake Sturgeon *Acipenser Ful\_escens*. orally exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzofuran. **Aquatic Toxicology**. 35: 79-92. 1996.

PALHETA, D. E TAYLOR, A. Mercury in environmental and biological samples from gold mining area in the Amazon region of Brazil. **Science of the Total Environment**. 168: 63-69. 1995.



PFEIFFER, W. C. E LACERDA, L. D. Mercury Inputs into the Amazon, Brasil. **Environmental Technology**. p. 325-330. 1988.

PEIFFER, W. C., MALM, O., LACERDA, L. D. & KAREZ, S., C. Contaminação ambiental e humana por metais pesados: uma revisão. In: O Ambiente Inteiro, a contribuição critica da Universidade a Questão Ambiental. Ed. UFRJ, p. 184-194. 1992.

PINTO, E., SIGAUD-KUTNER, T.C.S., LEITAO, M.A.S., OKAMOTO, O.K., MORSE, D., COLEPICOLO, P. Heavy metal-induced oxidative stress in algae. **Journal Phycology**. 39:1008–1018. 2003.

PORTO, J.I.R.; ARAÚJO, C.S.O.; FELDBERG, E. Mutagenic effects of mercury pollution as revealed by micronúcleos teste n three Amazonian species. **Environmental Research**. 97: 287-292. 2005.

PORVARI, P. Mercury levels of fish in Tucuruí hydroelectric reservoir and in River Mojú in amazonia, in the state of Pará, Brazil. **The Science of the Total Environment**. 175: 109-117. 1995.

RABITTO, I.S. Análises dos efeitos toxicológicos do TBT (tributilestanho) e chumbo inorgânico ( $Pb^{++}$ ) em *Hoplias malabaricus* (Bloch, 1794) (traíra) após exposição trófica e subcrônica: aspectos morfológicos e neurotóxicos. 2003. **Dissertação** (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal do Paraná.

RABITTO, I.S. ALVES COSTA, J.R.M.; SILVA DE ASSIS, H.C.; PELLETIER, F.M.; AKAISHI, F.M.; ANJOS, A. RANDI, M.A.F.; OLIVEIRA RIBEIRO, C.A. Effects of dietary Pb (II) and tributyltin on neotropical fish, *Hoplias malabaricus*: histopathological and biochemical findings. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. 60: 147-156. 2005.

RADI, A.A.R. E B. MATKOVICS, Effects of metal ions on the antioxidant enzyme activities, protein content and lipid peroxidation of carp tissues. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 90: 69-72.1988.

RADI, A.A.R.; HAI, D.Q.; MATKOVICS, B.; GABRIELAK, T. Comparative antioxidant enzyme study in fresh water fish with different types of feeding behavior. **Comparative Biochemistry and Physiology**. 81: 395-399. 1985.

ROEX, E.W.M.; KEIJZERS, R.; VAN GESTEL, C.A.M. Acetylcholinesterase inhibition and increased food consumption rate in the zebrafish, *Danio rerio*, after chronic exposure to parathion. **Aquatic Toxicology**. 64: 451-460. 2003.

ROMEO, M., BENNANI, N., GNASSIA-BARELLI, M., LAFAURIE, M., GIRARD, J.P. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax*. **Aquatic Toxicology**. 48:185–194. 2000.

SANCHEZ, W., PALLUEL, O., MEUNIER, L., COQUERY, M., PORCHER, J.M., AIT-AISSA, S. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickleback: relationship with hepatic metal levels. **Environmental Toxicology Pharmacology**. 19: 177–183. 2005.

SANTOS, E. **Peixes de água doce**. Belo Horizonte, ed. Itatiaia Limitada, v. 02, p. 201-203 e 9-19. 1981.

SCERBO, R.; RISTORI, T.; STEFANINI, B.; RENIERI, S.D. BARGHIGIANI, C. Mercury assessment and evaluation of its impact on fish in the Cecina river basin (Tuscany, Italy). **Environmental Pollution**. 135: 179-186. 2005.

- SCHROEDER, W.H. E MUNTHE, J. Atmospheric Mercury – An Overview. **Atmospheric Environment**. 32 (5): 809-822. 1998.
- SILVA DE ASSIS, H.C. Einsatz von Biomarkern zur summarischen Erfassung von Gewasserverschmutzungen. Thesis presented at Technical University of Berlin, Germany, p.99. 1998.
- SILVA, A.M. Toxicologia do mercúrio no meio ambiente. Centro de Recursos Educacionais. p. 1-26. São Paulo. 1988.
- SILVA FILHO, M. V.; OLIVEIRA, M. M.; CUNHA, B. V. L. F.; ALVES, M. V. & CUNHA, B. J. (2000). Validação de espécies sentinelas para biomarcação com colinesterase de peixes. In: Ecotoxicologia: perspectivas para o século XXI (ESPÍNDOLA, E. L. G.; PASCHOAL, C. M.R. B.; ROCHA, O.; BOHERER, M. B. C. & OLIVEIRA NETO, A. L. ) São Carlos, Rima. 2000.
- SIMONEAU, M.; LUCOTTE, M.; GACEAU, S.; LALIBERTÉ, D. Fish growth rates modulate mercury concentrations in walleye (*Sander vitreus*) from eastern Canadian lakes. **Environmental Research**, 98: 73-82. 2004.
- STOIBER, T.; BONACKER, D.; BOHM, K. J.; BOLT, R. T.; DEGEN G. H.; UNGER, E. Disturbed microtubule function and induction and micronuclei by chelato complexe mercury (II). **Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. 563: 97-106. 2004.
- STRANDBERG, B.; STRANDBERG, L.; VAN BAVEL, B.; BERGQVIST, P.-A.; BROMAN, D.; FALANDYSZ, J.; NAFF C., PAPAKOSTA, O., ROLFFAND, C., RAPPE, C. Concentrations and spatial variations of cyclodienes and other organochlorines in herring and perch from the Baltic Sea. **Science Total Environmental**. 215: 69–83. 1998.
- STURM, A.; SILVA DE ASSIS, H.C.; HANSEN, P.D. cholinesterases of marine teleost fish: enzimological characterization and potencial use in monitoring of neurotoxic contamination. **Marine Environmental Research**. 47: 389-398. 1999.
- SWARTZ, C.D.; DONNELLY, K.C.; ROWE, G.T.; ROGERS, W.J. PAKIMIKOV, G.M.; MEKHTIEV, A.A.; KASIMOV, R.; McDonald, T.J. WICKLIFE, J.K., PRESLEY, B.J.; BICKHAM, J.W. Chemical contaminants and their effects in fish wildlife from the industrial zone of Sumgayit, Republic of Azerbaijan. **Ecotoxicology**. 12: 509-521. 2003.
- TAKASHIMA, F. E HIBIYA, T. **An Atlas of fish histology: normal and pathological features**, 2ª Edição. New York. 1995.
- THIYAGARAJAH, A.; HARTLEY, W.R.; MAJOR, S.E.; BROXSON, M.W. Gill Histopathology of Two Species of Buffalo Fish From a Contaminated Swamp. **Marine Environmental Research**. 42 (1-4): 261-266. 1996.
- THOPHON, S.; KRUATRACHUEA, M., UPATHAMA, E.S.; POKETHITIYOOKA, P.; SAHAPHONGB, S.; JARITKHUANC, S. Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer*, in acute and subchronic cadmium exposure. **Environmental Pollution**. 121:307–320. 2003.
- TJALKENS R.B.; VALERIO J.R.L.G.; AWASTHI Y.C.; PETERSEN D.R. Association of glutathione S-transferase isozyme-specific induction and lipid peroxidation in two inbred strains of mice subjected to chronic dietary iron overload. **Toxicology and Applied Pharmacology**. 151: 174-181. 1998.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; NICO, P.E.V. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. 13: 57-149. 2003.

VÀRO, I.; NAVARRO, J.C.; AMAT, F.; GUILHERMINO, L. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass (*Dicentrarchus labrax*). **Pesticide Biochemistry and Physiology**. 75: 61-72. 2003.

VERTA, M.; REKOLAINEN, S.; kinnunen, k. Causes of increase fish mercury levels in Finnish reservoirs. Publication of Water Research institute, national board of Waters, Finland. 65: 44-58. 1986.

WHO – **World Health Organization. Environmental Health Criteria 118**. Inorganic Mercury. Geneva. 1991.

## ANEXOS

## **Processamento das peças de fígado e brânquias para a observação por Microscopia de Luz**

Fixador – Alfac (Etanol 80%, Formol 40% e Ácido acético glacial)

Técnica a ser utilizada – imersão

Tempo de fixação – 15 horas

Desidratação - Etanol 80% por 1: 30 hora

Etanol 90% por 1: 30 hora

Etanol 95% por 1: 30 hora

Etanol 100% por 30 min. 3 vezes

Diafanização - xilol + Etanol (100%) por 1 hora

xilol puro por 1 hora

xilol puro por 15 min.

Inclusão - permanece na estufa por 2 horas

Emblocagem - permanece na bancada por 2 horas

Trimagem - remove-se o excesso de paraplat do material

Microtomia – obtenção dos cortes (5µm)

Montagem das lâminas permanentes:

Desparafinização – xilol por 5 min. Por 2 vezes

Hidratação – álcool 100% por 5 min. 3 vezes

álcool 90% por 5 min.

álcool 70% por 5 min.

álcool 50% por 5 min.

Água destilada por 1 min.

Coloração – Hematoxilina por 1 min.

Eosina por 30 Seg.

Desidratação – Etanol 90% por 5 min.

Etanol 100% por 5 min. 2 vezes

Etanol+ xilol por 5 min.

Xilol puro por 5 min. 2 vezes

Montagem – coloca-se uma lamínula sobre o corte.



## **Processamento das peças de fígado e brânquias para a observação por Microscopia Eletrônica da Transmissão**

Fixador – Karnosvisk (Glutaraldeído 2,5%, Paraformaldeído 4% e Cacodilato 0,1M)

Técnica a ser utilizada – imersão

Tempo de fixação – 2 horas em temperatura ambiente

Lavagem do fixador – lavar por 10 min. 3 vezes com tampão cacodilato (0,1M)

Pós fixação (Tetróxido de ósmio) – pós fixação com ósmio por 1 hora

Lavagem pós-fixação – lavar as peças por 10 min. Em tampão cacodilato 0,1M

Lavar as peças por 10 min. em água destilada 2 vezes.

Pós fixação (acetato de uranila) – pós fixação com uranila por 1 hora

Lavagem do pós fixador – lavar por 10 min. em água destilada 3 vezes

Desidratação - Etanol 30% por 1:30 hora

Etanol 50% por 10 min.

Etanol 70% por 10 min.

Etanol 95% por 10 min.

Etanol 100% por 20 min. 3 vezes

Preparo das peças à inclusão – óxido de propileno por 10 min 3 vezes

Inclusão – óxido de propileno e resina 1:1 por 1 hora

óxido de propileno e resina 1:2 por 1 hora ou overnight

Emblocagem - permanece na estufa a 60°C por 1 hora

Trimagem - remove-se o excesso de resina do material

Ultramicrotomia – obtenção dos cortes

Contrastação – uranila 5% por 20 min.

Lavagem do material contrastado com uranila-lavar 3 vezes em água destilada, mergulhando cada telinha 10 vezes em cada beaker

Contrastação – Reynolds por 20 min.

Lavagem do material contrastado com Reynolds – o mesmo procedimento usado para uranila.

## Protocolos de Análises Bioquímicas

**\* Após a retirada das amostras do freezer manter sempre as mesmas em isopor com gelo**

### 1. CATALASE (AEBI, 1984)

#### Princípio do Método

Decréscimo de absorbância a 240nm devido à degradação do Peróxido de Hidrogênio ( $H_2O_2$ ) em água ( $H_2O$ ).

#### Procedimento para Tecido

#### Processamento da amostra

a) Homogeneização da amostra de fígado

- Pesar uma porção da amostra (ex: 0,100gr de tecido);
- Homogeneizar a amostra em 4ml de Tampão Fosfato a 0,1M pH 6,5 no Homogeneizador  $H_2O_2$ .

b) Centrifugar a 10000xg 30min 4 °C;

c) Se houver formação de gordura cuidar p/ não misturar com a amostra, com a pipeta Pasteur;

d) Retirar o sobrenadante que será utilizado na análise.

Obs. A amostra deverá ter a aparência translúcida, caso contrário deve ser diluída novamente. Pode ser congelada uma única vez.

e) Amostra deve ser congelada a -80 °C.

#### ANÁLISE:

#### Meio de Reação (50ml)- $H_2O_2$ ~ 20mM

- Utilizar um frasco de 50ml envolto em papel alumínio;
- 2,5 ml de Tampão TRIS 1M, EDTA 5mM pH 8;
- 115 ml de  $H_2O_2$  30% (colocar por último na solução),
- 47,4 ml de água milliqué;
- Misturar e agitar;
- Manter em Banho Maria 25/°C.

OBS: Essa quantidade de reagente dá p/ aprox. 9 amostras com 4 réplicas cada em um total de 36 leituras.

## Leitura

- Medir a absorbância de 240nm;
- Período de 1min e 30s (p/ analisar os melhores 60s);
- Utilizar o intervalo de 60s na curva para calcular o  $\Delta$  absorbância.  $\text{Min}^{-1}$

## Padronização

Testar diferentes concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  p/ elaborar uma curva de concentração de substrato x ativ. da enzima.

EX. 10 $\mu\text{l}$  da amostra -990 $\mu\text{l}$  de solução de reação 10mM.

## Espectrofotometria

- Pegar a cubeta de quartzo na parte fosca;
- Colocar a solução de reação;
- Inclinar levemente a cubeta, colocar a amostra na parede da cubeta, cuidado para a amostra não escorrer na solução de reação;
- Tampar a cubeta com papel filme, inverter a cubeta 3X p/ misturar, tirar o papel filme e colocar no aparelho p/ realização da leitura.

**Obs. Realizar o ultimo procedimento o mais rápido possível porque a reação de decomposição de do  $\text{H}_2\text{O}_2$  é extremamente rápida.**

**Medir a concentração de proteína da amostra ( BREDFORD, 1976).**

## 2. GLUTATIONA-S-TRANSFERASE (GST) (KEEN et al, 1976 com modificação)

### Princípio do método

GST catalisa a reação do substrato CSNB com o GSH, formando um tioéter ( $\epsilon = 9,6\text{mM.cm}^{-1}$ ) que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância a 340nm.

## GLUTATIONA-S-TRANSFERASE NO FÍGADO

### Processamento da amostra

#### 1. Homogeneização da amostra de fígado

- Pesar uma porção da amostra (ex: 0,100gr de tecido);
- Homogeneizar a amostra em 4ml de Tampão Fosfato a 0,1M pH 6,5 no Homogeneizador  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

2. Centrifugar a 10000xg 30min 4 °C;
  3. Se houver formação de gordura cuidar p/ não misturar com a amostra, com a pipeta Pasteur;
  4. Retirar o sobrenadante que será utilizado na análise.
- Obs. A amostra deverá ter a aparência translúcida, caso contrário deve ser diluída novamente. Pode ser congelada uma única vez.
5. Amostra deve ser congelada a -80 °C.

## **ANÁLISE**

### **Meio de reação**

#### **Leitura**

- Medir a absorbância 340nm no espectrofotômetro de microplaca;
- Período de 180s;
- Utilizar o intervalo de 15s.

#### **Espectrofotometria**

- Identificar a microplaca;
- colocar 100µl de amostra ;
- rapidamente com uma pipeta automática, colocar 200µl de solução de reação em cada pocinho;
- Fazer a leitura.

### **Medir a concentração de proteína (BRADFORD, 1976)**

#### **Atividade da GST**

$$\Delta A/\text{Min} = (A_{180} - A_{60})/2$$

$$\text{Atividade} = (\Delta A/\text{Min} * 1000) / (9,6 * 0,9) \text{ onde: } \epsilon = 9,6 \text{ mM} \cdot \text{cm}^{-1}$$

0,9cm = altura da cavidade da placa

$$\text{Atividade específica} = \text{atividade/proteína} ( \text{mmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mgproteína}^{-1} )$$

### **3. LPO Lipoperoxidação - Método FOX - (JIANG et al., 1992)**

#### **Processamento pra LPO (TECIDO)**

1. Descongelar amostras (Fígado);
2. Pesar as amostras de fígado tirando o excesso de sangue em papel toalha antes da pesagem\*;
6. Homogeneizar as amostras em 1ml de água deionizada e metanol 30% (1:1);
7. Sonicar por 2min;

8. Separar alíquota para proteína (100µl);
9. Colocar no eppendorf de 2ml, 300µl do homogenato e 1500µl do meio de reação;
10. Incubar no eppendorf por 30min em temperatura ambiente, não se esquecendo do branco que deve ser incubado também;

**Obs.** O Branco é somente o meio de reação (1500µl) mais água deionizada (300µl);

11. Centrifugar a 2000xg por 5min;
12. Pipetar 300µl do sobrenadante, colocando na microplaca;
13. Medir a 570nm

\*importante padronizar a pesagem entre 0,2000 - 3000gr

### **Solução de reação (deve ser preparada na hora – não pode ser armazenada)**

- Misturar os reagentes na seguinte ordem:

- 1 – Metanol (grau HPLC) 90% (~90% do volume final);
- 2 – 100 µM Xilenol Laranja;
- 3 – 25 mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;
- 4 – 4 mM BHT (hidroxitolueno butilado) – OBS: diluir em um pouco de metanol puro e acrescentar na solução, a fim de facilitar sua solubilização);
- 5 – 250 µM FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> (sulfato ferroso amoniacal);
- 6 – Completar com Metanol / H<sub>2</sub>O para acertar o volume (se necessário) e a concentração final de metanol (90%).

### **Para 50 ml de solução:**

BHT – 0,0441 g de BHT em 1 ml de Metanol PA.

Laranja de Xilenol – 0,0038 g de Laranja de xilenol em 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Sulfato ferroso Amoniacal – 0,0049 g de FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> em 1 ml de H<sub>2</sub>O.

Ácido sulfúrico – 0,1226 g (98%) ou 125,1 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.

### **Pouco antes do uso:**

- 1° - Num tubo adicionar 43,875 ml de metanol PA + 3 ml de H<sub>2</sub>O (metanol ~90%);
- 2° - Adicionar solução de laranja de xilenol (1 ml) e agitar;
- 3° - Adicionar 125,1 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> e agitar;
- 4° - Adicionar solução de BHT (1 ml) e agitar;
- 5° - Adicionar solução de FeSO<sub>4</sub>.NH<sub>4</sub> (1 ml) e agitar;
- 6° - Coloração da solução final deve tender do dourada ao alaranjada.

[Hidroperóxidos] = Abs. Diluição . 1000 / (ε . 0,9. [proteínas])

Onde:

[Hidroperóxidos] = nmol hidroperóxidos . mg proteínas<sup>-1</sup>

Abs. = Absorbância a 560 nm já descontando o branco



$\varepsilon$  = coeficiente de extinção (para  $\text{H}_2\text{O}_2$ , Cumeno hidroperóxido ou butil hidroperóxido) =  $4,3 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  ( $43 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{ml} \cdot \text{cm}^{-1}$ )

Diluição = Diluição da amostra

1000 = valor para conversão de  $\mu\text{mol}$  para  $\text{nmol}$

0,9 = fator de correção do volume de solução no poço

[proteínas] = concentração de proteínas em  $\text{mg} \cdot \text{ml}^{-1}$

#### 4. COLINESTERASE

##### Preparação das amostras de músculo

1. Pesar 0,100gr de amostra;
2. Homogeneizar em 2ml de tampão fosfato;
3. Colocar em eppendorf não esquecendo de separar alíquota para proteína;
4. Centrifugar a 10rpm 20min a  $4^\circ\text{C}$ ;
5. Manter as amostras sempre no gelo.

##### Meio de Reação

##### DTNB (10mM)

- 79,2mg de DTNB;
- 20ml de Tampão Fosfato;
- 30mg de  $\text{NaHCO}_3$ ;
- Misturar tudo em um Becker e aliquotar em eppendorfs de 2ml identificados;
- Manter os eppendorffs no freezer.

**OBS.** Depois que tem a solução de DTNB, no dia do uso tirar do freezer e fazer o cálculo de quanto de solução será necessário.

**EX.**  $200\mu\text{l} \times 4 \text{ réplicas} \times n^\circ \text{ de amostra}$

##### ATC (Acetilcolina)

1M-----289,2gr ATC

9mM-----X

$X = 2602,8\text{mg p/ } 1000\text{ml de água}$

$2,6 \text{ mg p/ } ,1\text{ml de água}$

$0,0026\text{g p/ } 1\text{ml de água (p/ uma placa de 96 poços } \sim 9,6\text{ml)}$

##### Processamento:

Na placa colocar:

- 50µl da amostra diluída (1:10);
- 200µl de DTNB;
- 50µl ATC.

#### **- Leitura no Espectrofotômetro**

**Quantificação da concentração de proteínas pelo método de Bradford**  
(BRADFORD, 1976)

#### **Padronização:**

- Para cada tecido há uma diluição específica que deve ser padronizada.

#### **Exemplo:**

Para fígado e cérebro a diluição 1:20

Para músculo 1:10

#### **BSA**

- Pesa 5mg de BSA (Armazenado em freezer) e coloca-se 5ml de água;
- Fazer alíquotas de 0,5ml e colocar em eppendorf de 1ml.

#### **No dia do uso:**

- Em 1 eppend. Colocar 100µl de água deionizada p/ 100µl de BSA, AGITAR no vortex identificando como 500 de proteína;
- Pegar 100µl da solução 500 e 100µl de água deionizada, identificar como solução 250;
- Pegar 100µl da solução 250 e 100µl de água, identificar 125.

#### **No momento da análise:**

- Pipetar 10 µl da amostra mais 250 µl de BRADFORD em cada pocinho da placa
- Para os padrões:  
Branco = 10µl de água e 250µl de BRADFORD  
Padrões de BSA = 10µl da solução 125 e 250µl de Brad.  
10µl da solução 250 e 250µl de Brad.  
10µl da solução 500 e 250 µl de Brad.

**Medir absorbância** a 595 – 600 nm após 2 min (estável até 1h).

**Descontar o valor do branco** (b=0)

**Determinar a equação da reta ( $y=ax + b$ ), o valor da linearidade ( $R^2$ ) e calcular a partir dela as concentrações de proteínas (y = absorbância, x = concentração de proteínas).**